ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΨΥΧΑΝΘΩΝ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΨΥΧΑΝΘΩΝ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

“Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ: Καθηγητής Γενικής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κ. ΛΙΑΔΑΚΗ: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ε. ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

“ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΨΥΧΑΝΘΩΝ”

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

“ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ”

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: 22
Συνολικός αριθμός σελίδων: 240
Συνολικός αριθμός εικόνων: 41
Συνολικός αριθμός πινάκων: 33
Συνολικός αριθμός γραφημάτων: 19
Συνολικός αριθμός παραρτημάτων: 1
Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 352

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Τα ψυχανθή και ιδιαίτερα οι καρποί τους, τα όσπρια, που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη), καρδιαγγειακές παθήσεις και διαβήτη. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα των οσπρίων σε πρωτεΐνες, μια πληθώρα βιοδραστικών πολυφαινολικών ενώσεων έχει αναγνωριστεί σε αυτά. Οι ενώσεις αυτές, είναι πιθανώς υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες των ψυχανθών. Το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις ποικιλίες των ψυχανθών καθώς και μεγάλη ποικιλομορφία στην σύστασή τους σε φυτοχημικές ενώσεις, καθιστά σημαντική τη διεξαγωγή ερευνών πάνω στις βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα ψυχανθή καθώς και τις βιολογικές τους ιδιότητες. Στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων δοκιμάστηκαν συνολικά 34 υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από 11 φυτά ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Ακόμη, επηρέαζαν τη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, ανέστειλαν τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι και είχαν μικρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στην επαγόμενη από μπλεομυκίμη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα. Τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων τα οποία είναι υπεύθυνα για τις παρατηρούμενες ιδιότητες ήταν οι περιεχόμενες σε αυτά πολυφαινολικές ενώσεις.

Τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) είχαν τις πιο ισχυρές ιδιότητες στις μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Γι' αυτό το λόγο το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* επιλέχθηκε για τη μελέτη των χημειοπροστατευτικών του ιδιοτήτων σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα εμφανίζουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες και στα κυτταρικά συστήματα που εξετάστηκαν. Ωστόσο, πρέπει να υπάρχει προσοχή στον προσδιορισμό των δραστικών και μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς μετά από κάποια συγκέντρωση τα βιοδραστικά συστατικά τους μπορεί να δρουν προοξειδωτικά και να είναι τοξικά για τα κύτταρα. Αυτό φαίνεται από

το γεγονός ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 μg/mL παρουσίασε προοξειδωτικές ιδιότητες. Η παρούσα μελέτη προτείνει τη χρησιμοποίηση των εκχυλισμάτων ψυχανθών ως πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων και ως υποψήφια συμπληρωματικά στοιχεία σε βιολειτουργικά τρόφιμα ιδιαίτερα για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ακόμη, προτείνει το φυτό *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) ως τη σημαντικότερη πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Οι παρατηρούμενες ιδιότητές του καθιστούν την *in vivo* μελέτη των χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων ενδιαφέρουσα.

Γίνε τοξότης των ονείρων σου
κάνε την θέλησή σου τόξο και τα όνειρά σου βέλη
και τόξευσέ τα μακριά,
όσο παίρνει το μάτι του ανθρώπου
μη φοβάσαι,
το μόνο στέρεο έδαφος
σε αυτή τη γη είναι το δικό σου μονοπάτι
"Ο χορός των απαλών ανθρώπων" Βάνα Λυδάκη

Στους γονείς μου, τις αδελφές μου

και τη γιαγιά μου Χρυσούλα που
πάντα με προέτρεπε στη γνώση

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά των ανθρώπων που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Δημήτριο Κουρέτα τόσο για την υπόδειξη του θέματος όσο και για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποκομίσω πάρα πολλές γνώσεις και εμπειρίες. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε την επιστημονική συμπαράστασή του και για το ότι μου έμαθε να έχω υπομονή στις δυσκολίες και να μη φοβάμαι να ρισκάρω.

Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για τις υποδείξεις τους και την προθυμία τους να απαντήσουν κάθε μου ερώτηση. Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Λεωνίδα, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Ευτυχία Ασπροδίνη και την λέκτορα κ. Καλλιόπη Λιαδάκη οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ τον καθηγητή της Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αλέξανδρο-Λέανδρο Σκαλστούνη και τους κ. Νεκτάριο Αλιγιάννη και κ. Απόστολο Αγγελή για την συνεργασία και την αρχική επεξεργασία των φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών που μελετήσαμε καθώς και για τις πολύτιμες πληροφορίες που μου έδωσαν. Ευχαριστώ ακόμη την επίκουρο καθηγήτρια κ. Αφροδίτη Σιβροπούλου από το Βιολογικό Τμήμα του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη χορήγηση του βακτηριακού στελέχους *Salmonella typhimurium* TA102.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Μαρκουλάτο καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες και τους προπτυχιακούς φοιτητές που δούλευαν στο εργαστήριό του, για την παροχή της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2. Τους ευχαριστώ για την βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων που περιλάμβαναν κυτταροκαλλιέργειες. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη λέκτορα κ. Μαρία Κοντού για τη βοήθειά

της και τις υποδείξεις της στο κομμάτι της κινητικής ανάλυσης στα πειράματα που αφορούσαν τις επιδράσεις στην ενζυμική δραστικότητα.

Θα ήταν λίγο ένα ευχαριστώ στον συνάδελφό μου Αριστείδη Βεσκούκη ο οποίος εκτός από άψογος συνεργάτης, μου στάθηκε σαν πραγματικός φίλος. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Αντώνιο Κυπάρο, Μιχάλη Νικολαΐδη, Δημήτριο Στάγκο, Καλιόπη Λιαδάκη και Αλεξάνδρα Κισκίνη για την φιλία τους με την οποία με περιέβαλαν, την άψογη συνεργασία καθώς και τη στήριξή τους στις όμορφες αλλά και τις δύσκολες στιγμές.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους μου Γεωργία Μπούρου, Αλμπιόνα Δερβίση, Μαρία Βάϊου, Παντελή Αθανασιάδη, Μαρία Ζήκου, Δημήτρη Παλαιογιάννη και Μαρία Κανάκη καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Νικόλαο Πορτέση, Αγορίτσα Αβραμούλη, Μαρία Τσούκα, Παναγιώτη Μάργαρη, Θάλεια Κερασιώτη, Ελένη Τζανακούλη, Κατερίνα Ιωάννου, Ελένη Ρέρη για την πολύ καλή συνεργασία τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής τους εργασίας. Ευχαριστώ επίσης και όλους τους φοιτητές/τριες που εργάστηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών στη διάρκεια αυτών των χρόνων για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λεωνίδα Τούσια για την συμμετοχή του στο αρχικό κομμάτι της διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους υποψήφιους διδάκτορες που δούλευαν και εκείνοι σαν και εμένα την ίδια χρονική περίοδο για την φιλία τους, την στήριξή τους και την άψογη διαεργαστηριακή συνεργασία μας.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά, τους γονείς μου και τις αδελφές μου για την αμέριστη και πολυεπίπεδη στήριξη, υπομονή και αγάπη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να φέρω σε πέρας το ταξίδι αυτής της διδακτορική διατριβής.

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2006-2010 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Δημήτριου Κουρέτα.

Γενικά στοιχεία, σκοπός και σημασία της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η χρησιμοποίηση φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοδραστικά στοιχεία. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση ψυχανθών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη και παχυσαρκία. Οι ευεργετικές ιδιότητες αποδίδονται στα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά τους. Ο σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων 34 φυτικών εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ελληνικών ψυχανθών ως πιθανή πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Περισσότερη έμφαση δόθηκε στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων οι οποίες αντικατοπτρίζουν έναν σημαντικό μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης. Τα εκχυλίσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν πηγή σημαντικών αντικαρκινικών παραγόντων ή να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικοί παράγοντες στη διατροφή.

Ερωτήματα

1. Αν τα εκχυλίσματα των ψυχανθών έχουν βιολογικές ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν ως σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων.
2. Ποια είναι τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων στα οποία αποδίδονται οι πιθανές χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες και ποιος ο τρόπος δράσης τους.
3. Ποιες είναι οι δράσεις των εκχυλισμάτων και καθαρών βιοδραστικών μορίων σε κυτταρικά και ενζυμικά συστήματα, καθώς και παρατήρηση της σημασίας των δραστικών συγκεντρώσεων στα συστήματα αυτά.

Επεξήγηση όρων

Βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις: Είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά και έχουν ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις.

Χημειοπροστασία: Ορίζεται η πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσοτέρων ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών.

Όσπρια: Χαρακτηρίζονται οι καρποί και τα σπέρματα διάφορων ψυχανθών, τα οποία καταναλώνονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

Ελεύθερη ρίζα: Χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα.

Αντιοξειδωτικό: Χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος.

Δημοσιεύσεις

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις:

- C. Spanou, D. Stagos, L. Tousias, A. Angelis, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas **2007** Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of *Leguminosae* plants using different *in vitro* assays. *Anticancer Research* 27 (5): 3403-4310.
- C. Spanou, G. Bourou, A. Dervishi, N. Aligiannis, A. Angelis, D. Komiotis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas **2008** Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6967-6976.
- C. Spanou, D. Stagos, N. Aligainnis, D. Kouretas **2010** Influence of potent antioxidant *Leguminosae* family plant extracts on growth and antioxidant defence system of Hep2 cancer cell line. *Journal of Medicinal Food* 13: 149-155.
- C. Spanou, D. Stagos, K. Liadaki, K. Ioannou, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, Kouretas D. **2010** Protective effects of legume plant extracts on *tert*-Butyl hydroperoxide-induced oxidative stress and cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells. (under preparation).
- C. Spanou, A.S. Veskoukis, D. Stagos, K. Liadaki, A.L. Skaltsounis, M. Anastasiadi, S.A. Haroutounian, D. Kouretas **2010** Effects of greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activity. *Food Chemistry* (under review).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	(2,2´-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride))	
ABTS	(azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid))	
ARE	(Antioxidant Response Element)	στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης
ASE	(Accelerated Solvent Extractor)	συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης
CAT	(catalase)	Καταλάση
CHD	(Coronary Heart Disease)	στεφανιαία νόσος
DPPH	(1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
FC	(Folin-Ciocalteau)	αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau
FCPC	(Fast Centrifugal Partition Chromatography)	χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση
G6PD	(glucose-6-phosphate ehydrogenase)	δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης
GA	(gallic acid)	γαλλικό οξύ
GPx	(glutathione peroxidase)	περοξειδάση της γλουταθειόνης
GR	(gloutathione reductase)	ρεδουκτάση/αναγωγάση της γλουταθειόνης
GSH	(redused form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	(oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
HAT	(Hydrogen Atom Transfer)	μεταφορά υδρογόνου
HRP	horseradish peroxidase	
NADPH	β-Nicotinamide adenine di-nucleotide phosphate, reduced form	Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NBT	(Nitro Blue Tetrazolium)	
NCI	National Cancer Institute	Διεθνές ινστιτούτο καρκίνου
PBMCs	(Peripheral Blood Mononuclear Cells)	μονοκύτταρα περιφερικού αίματος
RBCL	(Red Blood Cell Lysate)	ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα
RNS	(Reactive nitrogen species)	δραστικές μορφές αζώτου
$ROO^{\bullet}$	(peroxyl radicals)	ρίζες περοξυλίου
ROS	(Reactive Oxygen Species)	δραστικές μορφές οξυγόνου
RSC	(Radical Scavenging Capacity)	αντιοξειδωτική ικανότητα
SET	(Single Electron Transfer)	μεταφορά ηλεκτρονίου
SOD	(superoxide dismutase)	υπεροξειδική δισμουτάση
TAC	(Total Antioxidant Capacity)	ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS	(Thiobarbituric Reactive Substances)	ουσίες που αντιδρούν με το θειοαρβιτουρικό οξύ
t-BOOH	(*tert*-butyl hydroperoxide)	
TCA	(Trichloracetic Acid)	τριχλωροοξικό οξύ
Topo I	(Topoisomerase I)	τοποϊσομεράση Ι
TPC	(Total Polyphenol Content)	συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο
XO	(xanthine oxidase)	οξειδάση της ξανθίνης
H_2O_2	(hydrogen peroxide)	υπεροξείδιο του υδρογόνου
$O_2^{\bullet -}$	(superoxide radicals)	ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
$OH^{\bullet}$	(hydroxyl radicals)	ρίζες υδροξυλίου
TBA	(2-thiobarbituric acid)	2-θειοβαβιτουρικό οξύ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ψυχανθή

1.1. Γενικά

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae/Fabacae*, που αποτελεί ομάδα δικοτυλήδονων φυτών και περιλαμβάνει περίπου 700 γένη και περισσότερα από 18.000 είδη. Η οικογένεια φυτών *Leguminosae* ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και ταξινομείται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoideae*, τη *Caesalpinioideae* και τη *Faboideae*. Είναι συνήθως μονοετή φυτά, ωστόσο η ζωή τους μπορεί να κρατήσει μέχρι και τρία χρόνια (Kurlovich & Repyev, 1995).

Φύονται σχεδόν σ' όλα τα μέρη του κόσμου και αποτελούν πολύ σημαντικά φυτά με μεγάλο οικονομικό και διατροφικό ενδιαφέρον. Στα ψυχανθή κατατάσσονται τα καρποδοτικά φυτά, τα οποία καλλιεργούνται για την παραγωγή σπόρων ή καρπών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (όσπρια) και για ζωοτροφή. Ως όσπρια χαρακτηρίζονται οι καρποί και τα σπέρματα διάφορων ψυχανθών, τα οποία καταναλώνονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Εκτός από τους ξηρούς σπόρους σημαντικές ποσότητες ψυχανθών καταναλώνονται από τον άνθρωπο υπό τη μορφή χλωρών λοβών ή σπερμάτων. Τα κυριότερα εδώδιμα ψυχανθή είναι τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris* L.), τα ρεβίθια (*Cicer arietinum* L.), οι φακές (*Lens culinaris*), τα κουκιά (*Vicia faba*), τα λούπινα (*Lupinus* spp.), το λαθούρι (φάβα) (*Lathyrus sativus*) και τα μπιζέλια (*Pisum sativum* L.) καθώς επίσης και η σόγια (*Glycine max*) (Vasilopoulou et al., 2005; Παπακώστα, 2005).

Ακόμη, στα ψυχανθή ανήκουν και χορδοτικά φυτά, τα οποία καλλιεργούνται ως κτηνοτροφικά φυτά για παραγωγή ξηρού χόρτου και σπόρου για την κτηνοτροφία. Τα σπουδαιότερα ψυχανθή που καλλιεργούνται για παραγωγή ξηρού χόρτου, αλλά και για άλλες χρήσεις είναι η μηδική, ο βίκος και τα τριφύλλια, ενώ τα πιο σημαντικά ψυχανθή που καλλιεργούνται για το σπόρο τους και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στην κτηνοτροφία, είναι τα μπιζέλια, τα κτηνοτροφικά κουκιά, τα λούπινα και η σόγια (Παπακώστα, 2005). Ακόμη, τα ψυχανθή καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά, για τα ελαιούχα σπέρματά τους αλλά κυρίως για την ικανότητά τους να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (Παπακώστα, 2005; Kurlovich & Repyev, 1995).

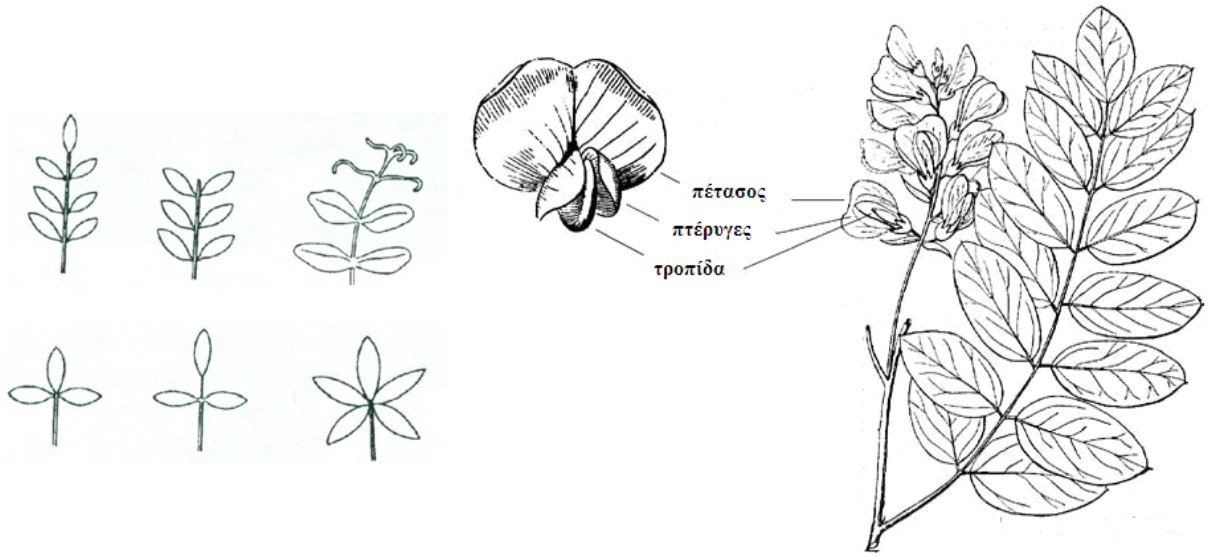
1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των ψυχανθών

Τα ψυχανθή έχουν τη μορφή μικρών ποωδών θάμνων ή ακόμα και δέντρων. Ωστόσο η μορφολογία τους είναι χαρακτηριστική και τα διακρίνει από άλλες οικογένειες φυτών.

1.2.1. Βλαστοί, φύλλα και άνθη

Οι βλαστοί φέρουν διακλαδώσεις και μπορεί να είναι λείοι ή τριχωτοί με όρθια, έρπουσα ή αναρριχώμενη ανάπτυξη. Οι βλαστοί διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ειδών ως προς το μήκος, τη διάμετρο, τον αριθμό των διακλαδώσεων κ.ά. Τα φύλλα τους είναι σύνθετα και σε ορισμένα γένη καταλήγουν σε έλικες (Εικόνα 1). Αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια που διαφέρουν σε υφή, σχήμα, αριθμό και μέγεθος ανάλογα με το είδος και την ποικιλία (Παπακώστα, 2005).

Τα άνθη των ψυχανθών είναι ψυχόμορφα, με χαρακτηριστική μορφολογία που διαφέρει από τα άνθη άλλων οικογενειών. Είναι ερμαφρόδιτα, με πέντε πέταλα και δέκα στήμονες. Τα πέταλα αποτελούνται από το μεγαλύτερο που είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους που ονομάζονται πτέρυγες και δύο άλλα ενωμένα μεταξύ τους που αποτελούν την τροπίδα (Εικόνα 1). Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες, των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι (Παπακώστα, 2005).



Εικόνα 1: Χαρακτηριστική μορφολογία των φύλλων και των ανθέων των ψυχανθών.

1.2.2. Καρποί και σπόροι

Ο καρπός των ψυχανθών είναι δίλοβος με δύο τοιχώματα, τα οποία συνδέονται με δύο ραφές. Ο λοβός ποικίλει σε σχήμα, υφή, χρώμα, μέγεθος ανάλογα με το είδος του ψυχανθούς. Μπορεί να είναι κυλινδρικός, πεπλατυσμένος, φυσαλιδοειδής, ευθύς, νεφρόμορφος δρεπανοειδης ή ελικοειδής. Κάθε λοβός στο εσωτερικό του περιέχει έναν ή περισσότερους σπόρους ενωμένους με το λοβό, διατεταγμένους σε γραμμική σειρά. Ο σπόρος των ψυχανθών αποτελείται από το περικάρπιο και το έμβρυο (Παπακώστα, 2005).

1.2.3. Ριζικό σύστημα

Κύριο χαρακτηριστικό των ψυχανθών είναι το ισχυρό πασαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Τόσο στην κύρια ρίζα όσο και στις διακλαδώσεις παρατηρούνται εξογκώσεις που ονομάζονται φυμάτια τα οποία σχηματίζονται από τη συμβιωτική δράση των αζωτοβακτηρίων κυρίως των γενών *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* (Παπακώστα, 2005). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται φυμάτια στις ρίζες χαρακτηριστικών ειδών ψυχανθών. Τα αζωτοβακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το αποδίδουν στα φυτά σε άμεσα αφομοιώσιμη μορφή. Η ιδιότητα των ψυχανθών να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο, τα καθιστά ικανά να αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Ακόμη συμβάλλουν στον εμπλουτισμό των εδαφών με άζωτο, από το οποίο επωφελούνται οι επόμενες καλλιέργειες. Ωστόσο, η λειτουργία μιας αποτελεσματικής συμβίωσης μεταξύ του φυτού και των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων είναι ένα αρκετά πολύπλοκο φαινόμενο που υφίσταται επιδράσεις τόσο ενδογενείς (προερχόμενες από το φυτό και τα βακτήρια), όσο και εξωγενείς (προερχόμενες από το άμεσο περιβάλλον των ριζών) (Παπακώστα, 2005; Smil, 1997).

Φακή **Λαθούρι** **Κουκιά**

Εικόνα 2: Φυμάτια σε ρίζες ψυχανθών.

1.3. Καλλιέργεια και κατανάλωση

Τα ψυχανθή καλλιεργούνται σε πολλές χώρες του κόσμου σε μεγαλύτερες ή σε μικρότερες εκτάσεις. Τα όσπρια σε παγκόσμιο επίπεδο καταλαμβάνουν μικρές σχετικά εκτάσεις και οι κύριες χώρες παραγωγής τους είναι οι Η.Π.Α., ο Καναδάς, η Τουρκία, η Κίνα και η Ιαπωνία και ορισμένες χώρες της Ευρώπης. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα όσπρια καλλιεργούνται σε ασήμαντες εκτάσεις για τη σπουδαιότητα τους και τα πλεονεκτήματά τους (Σκιαδάς, 2007). Ωστόσο, η καλλιέργειά και η κατανάλωσή τους στις χώρες της Μεσογείου, καθιστά τα όσπρια σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής (Vasilopoulou et al., 2005; Simopoulos, 2001). Όσον αφορά τα κτηνοτροφικά ψυχανθή οι παγκόσμια καλλιεργούμενες εκτάσεις είναι πάρα πολύ μικρές (Σκιαδάς, 2007).

Στην Ελλάδα, σε ότι αφορά την καλλιέργεια των οσπρίων, το σύνολο της καλλιεργούμενης έκτασης ανέρχεται σε 150.000 στρέμματα περίπου, με μέση παραγωγή τους 29.000 τόνους, εκ των οποίων τα φασόλια καλύπτουν το 64% των εκτάσεων και το 73% της συνολικής παραγωγής (Σκιαδάς, 2007). Τα όσπρια που καταναλώνονται κυρίως στην Ελλάδα είναι τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris* [κοινά φασόλια], *Phaseolus coccineus* [φασόλια γίγαντες]), οι φακές (*Lens culinaris*), τα μπιζέλια (*Pisum sativum*), η φάβα (*Lathyrus sativus*, *Lathyrus clymenum*), τα ρεβίθια (*Ciser arietinum*) και τα κουκιά (*Vicia faba*) (Εικόνα 3) (Vasilopoulou et al., 2005; Παπακώστα, 2005). Η καλλιέργεια των φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) συναντάται κυρίως στους νομούς Φλώρινας, Καστοριάς και Καβάλας, ενώ τα ρεβίθια (*Ciser arietinum*) στους νομούς Εύβοιας, Βοιωτίας, Φθιώτιδας και Κυκλάδων. Τα κουκιά (*Vicia faba*) καλλιεργούνται κυρίως στους νομούς Ηρακλείου και Αρκαδίας, ενώ το λαθούρι (*Lathyrus sativus*) και η φακή (*Lens culinaris*) στους νομούς Κορινθίας και Λάρισας αντίστοιχα (Σκιαδάς, 2007).

Εικόνα 3: Τα κυριότερα καταναλούμενα ψυχανθή στην Ελλάδα.

1.4. Σημασία των ψυχανθών στη διατροφή και την υγεία

Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει για τη σημασία των ψυχανθών στη διατροφή, αφορούν κυρίως τα όσπρια (Messina, 1999; Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Τα όσπρια, κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες καθώς και σε άλλα θρεπτικά στοιχεία (Campos-Vega, 2010). Σε πολλές περιοχές του κόσμου οι πρωτεΐνες των οσπρίων αποτελούν τη μοναδική διατροφική πηγή πρωτεΐνης. Ωστόσο στις αναπτυγμένες χώρες, εξαιτίας της πληθώρας αγαθών, στα πλαίσια υιοθέτησης υγιεινού τρόπου διατροφής, οι πρωτεΐνες των οσπρίων αντιπροσωπεύουν συμπληρωματική διατροφική πηγή πρωτεϊνών, ως σημαντικά λειτουργικά διατροφικά συστατικά (Duranti & Gius, 1997). Η κατανάλωση των ψυχανθών αποτελεί και πολύ σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής η οποία είναι ευρέως γνωστή για τις ευεργετικές τις επιδράσεις στην υγεία και ιδιαίτερα στις καρδιαγγειακές παθήσεις και σε διάφορες μορφές καρκίνου (Trichopoulou et al., 2000; Simopoulos, 2001; Vechia, 2004).

Το πιο μελετημένο ψυχανθές για τις ευεργετικές του επιδράσεις στην υγεία είναι η σόγια (*Glycine max*). Μελέτες είχαν παρατηρήσει ότι η συχνότητα του καρκίνου του προστάτη και του μαστού ήταν μεγαλύτερη στις Δυτικές χώρες από ότι σε χώρες της Ασίας (Ιαπωνία, Κίνα κλπ.) (Messina & Barnes, 1991; Coward et al., 1993; Messina et al., 1994). Ακόμη μετανάστες από την Ασία που ζουν στις Η.Π.Α. και διατήρησαν τις διατροφικές τους συνήθειες παρουσίασαν μικρότερα ποσοστά εμφάνισης των συγκεκριμένων μορφών καρκίνου σε σύγκριση με αυτούς που υιοθέτησαν το Δυτικό τρόπο διατροφής (Shimizu et al., 1991). Οι παρατηρήσεις αποδόθηκαν στην κατανάλωση προϊόντων σόγιας που αποτελεί πολύ σημαντικό κομμάτι της διατροφής στην Ασία. Έκτοτε, πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση προϊόντων σόγιας με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και του μαστού (Cederroth & Nef, 2009; Crozier et al., 2006; Humfrey, 1998), καθώς και καρδειαγγειακών παθήσεων (Park et al., 2005; Humfrey, 1998). Ακόμη η κατανάλωση σόγιας παρατηρήθηκε ότι έχει ευεργετικές επιδράσεις στα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης (Cassidy et al., 2006), στην οστεοπόρωση (Messina, 1997), το διαβήτη και την παχυσαρκία (Branca & Lorenzetti, 2005).

Γενικότερα, εκτός από τη σόγια, επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση οσπρίων με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις (Leterme, 2002; Kushi et al, 1999; Geil & Anderson, 1994). Μέχρι σήμερα περισσότερες από 60 μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση οσπρίων με επιδράσεις σε διάφορες μορφές καρκίνου

(Mathers, 2002; Rochfort & Panozzo, 2007). Πιο συγκεκριμένα η κατανάλωσή τους έχει συνδεθεί με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου κυρίως του παχέως εντέρου, του προστάτη καθώς και σε μικρότερο βαθμό του μαστού και του παγκρέατος (Mathers, 2002; Campos-Vega, 2010). Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι δρουν προστατευτικά απέναντι σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Anderson et al., 1999; Flight & Clifton, 2006; Bazzano et al., 2001), στο διαβήτη και την παχυσαρκία (Venn & Mann, 2004; Bell & Sears, 2003; Rizkalla et al., 2002). Η κατανάλωση οσπρίων μειώνει σημαντικά τα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό του αίματος και συμβάλλει στη μείωση εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου (CHD) και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων (Flight & Clifton, 2006; Leterme, 2002; Anderson & Major, 2002; Duane, 1997). Ακόμη, τα όσπρια έχουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, αποτελώντας σημαντική πηγή ενέργειας για τους διαβητικούς (Venn & Mann, 2004; Leterme, 2002; Rizkalla et al., 2002).

Οι ευεργετικές ιδιότητες των ψυχανθών αποδίδονται στα περιεχόμενα συστατικά τους. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί εκτός από τα κύρια διατροφικά τους συστατικά και στις περιεχόμενες σε αυτά φυτοχημικές ουσίες οι οποίες θεωρείται ότι είναι οι κύριες υπεύθυνες ενώσεις για τις ευεργετικές ιδιότητες των ψυχανθών (Rochfort & Panozzo, 2007).

1.5. Κύρια διατροφικά συστατικά των ψυχανθών

Παρά την μεγάλη ποικιλία και την ετερογένεια που υπάρχει στη χημική τους σύσταση τα ψυχανθή αποτελούν, όπως προαναφέρθηκε, πολύ σημαντική πηγή πρωτεϊνών και φυτικών ινών (Duranti & Gius, 1997; Campos-Vega, 2010; Messina, 1999). Ακόμη, έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε άμυλο, χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα και αποτελούν σημαντική πηγή φολικού οξέος, υδατανθράκων, βιταμινών και ιχνοστοιχείων όπως το Ca, Se, Fe, K, Mg, και Zn (Mathers, 2002; Campos-Vega, 2010; Anderson et al., 1999; Messina, 1999).

Η περιεκτικότητα των σπόρων των ψυχανθών σε πρωτεΐνες, οι οποίες συσσωρεύονται κατά την ανάπτυξή τους, υπερβαίνει το 20%. Η σημαντική τους περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες επεκτείνεται και στους βλαστούς και τα φύλλα. Στα φασόλια και στα μπιζέλια οι πρωτεΐνες αποτελούν το 20% του ξηρού τους βάρους ενώ στα λούπινα και τη σόγια φτάνουν το 38-40% (Guéguen & Cerletti, 1994). Τα τελευταία χρόνια οι διατροφικές πρωτεΐνες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον, ως μια κατηγορία βιομορίων με έμμεσες ή άμεσες βιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό. Οι πρωτεΐνες των οσπρίων έχουν σημαντική διατροφική αξία εξαιτίας των αμινοξέων τους. Παρότι

όλες οι πρωτεΐνες των οσπρίων έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα που περιέχουν θείο και σε τρυπτοφάνη, η περιεκτικότητά τους στο αμινοξύ λυσίνη είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με άλλους εδώδιμους σπόρους (δημητριακά) (Duranti, 2006). Οι διατροφικές πρωτεΐνες δεν αποτελούν μόνο πηγή δομικών και λειτουργικών στοιχείων μέσω των αμινοξέων τους αλλά μπορούν να έχουν και οι ίδιες βιολογικές επιδράσεις αποτελώντας πρόδρομους βιοδραστικών πεπτιδίων με ποικίλες ιδιότητες (Duranti, 2006; Duranti & Gius, 1997).

Ακόμη, οι φυτικές ίνες αποτελούν σημαντικό στοιχείο για τις προστατευτικές ιδιότητες των ψυχανθών απέναντι στον καρκίνο κυρίως του παχέος εντέρου, του μαστού και του παγκρέατος καθώς και για τη στεφανιαία νόσο (Kushi et al, 1999). Ακόμη, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας καθώς συμβάλλουν στην απώλεια βάρους (Slavin, 2005). Τα όσπρια και γενικότερα τα ψυχανθή εκτός των παραπάνω θρεπτικών συστατικών αποτελούν και σημαντική πηγή βιοδραστικών, φυτοχημικών ενώσεων.

2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις στα ψυχανθή

2.1. Γενικά

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Bidlack et al., 2000; Meskin et al., 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Etherton et al., 2002; Valko et al., 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlack et al., 2000; Meskin et al., 2002).

Όπως προαναφέρθηκε και η κατανάλωση ψυχανθών έχει συσχετιστεί με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις (Leterme, 2002; Kushi et al, 1999). Παρά την πολύ σημαντική διατροφική αξία των ψυχανθών ο αριθμός των πληροφοριών που αφορούν την περιεκτικότητά τους σε βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις, με εξαίρεση τη σόγια, είναι σχετικά μικρός (Crozier et al., 2009; Campos-Vega, 2010). Στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στους σπόρους και τους καρπούς τους, εξαιτίας της σημασίας των διατροφικών τους επιδράσεων, έχουν ταυτοποιηθεί πολλές πολυφαινολικές ενώσεις καθώς και κάποιοι αντιδιατροφικοί παράγοντες (Campos-Vega, 2010; Champ, 2002; Kalogeropoulos et al.,

2010). Τόσο στις πολυφαινολικές ενώσεις όσο και στους αντιδιατροφικούς παράγοντες που βρίσκονται στα ψυχανθή έχουν αποδοθεί σημαντικές αντικαρκινικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Champ, 2002; Rochfort & Panozzo, 2007). Ωστόσο εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας και ετερογένειας των ψυχανθών, οι περισσότερες έρευνες δίνουν έμφαση στην ταυτοποίηση και απομόνωση αυτών μορίων και όχι τόσο στις βιολογικές τους ιδιότητες. Ακόμη, η πολυπλοκότητα των ασθενειών, η συνεργική δράση των συστατικών που βρίσκονται στα ψυχανθή, καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών των βιολογικών ιδιοτήτων των επιμέρους βιοδραστικών φυτοχημικών ενώσεων των ψυχανθών.

2.2. Πολυφαινολικές ενώσεις

Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά. Τα τελευταία χρόνια ένα πολύ μεγάλο εύρος ερευνών ασχολείται με την ταυτοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα και ποικίλα φυτικά παράγωγα (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006). Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών, είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006). Ιδιαίτερα οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες καθώς αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων.

2.2.1. Χημική δομή και ταξινόμηση

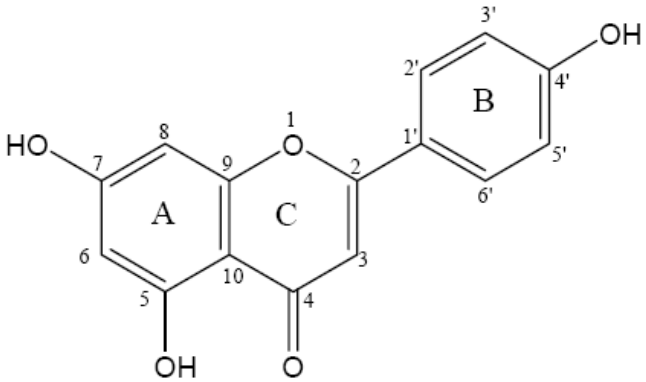
Οι πολυφαινολικές ενώσεις ταξινομούνται με ποικίλους τρόπους, ως προς την προέλευση, τις ιδιότητες ή ως προς τη χημική τους δομή. Μια πολυφαινολική ένωση αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Vermeris & Nicholson, 2006).

Με βάση την χημική τους δομή, ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα μη φλαβονοειδή χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες (Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006).

Φλαβονοειδή

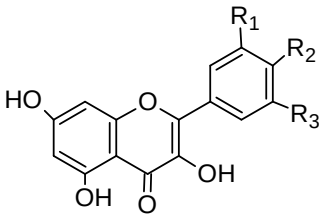
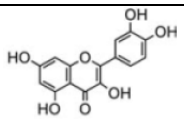
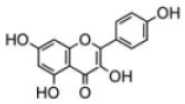
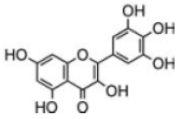
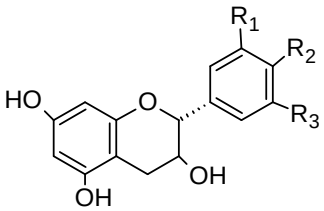
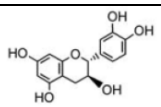
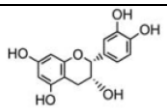
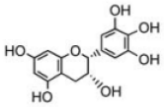
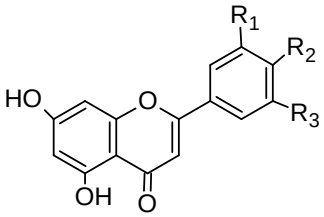
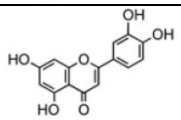
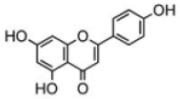
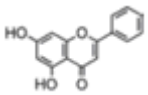
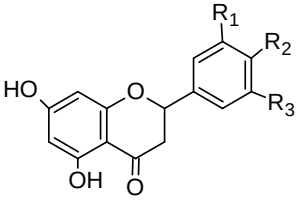
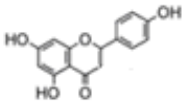
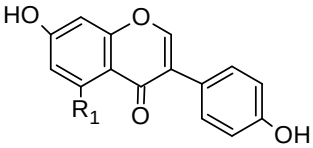
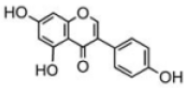
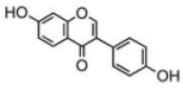
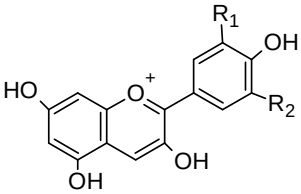
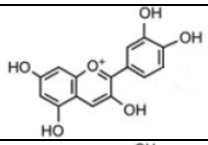
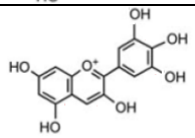
Τα φλαβονοειδή συνιστούν την πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Περισσότερες από 5000 ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε ποικίλες φυτικές πηγές. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6-C3-C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών (Εικόνα 4) μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες (Andersen & Markham, 2006). Οι υδροξυλικές ομάδες βρίσκονται συνήθως στις θέσεις 5, 7, 4΄ (Εικόνα 4), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να βρεθούν και σε άλλες θέσεις. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες τις φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες (Πίνακας 1) (Manach et al. 2004; Andersen & Markham, 2006).

Τα περισσότερα φλαβονοειδή βρίσκονται στην φύση κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών. Τα σάκχαρα είναι συνήθως συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στον Α δακτύλιο της δομής των φλαβονοειδών, ωστόσο πιο συχνά το σάκχαρο είναι συνδεμένο με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα που βρίσκεται στην θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 4). Ανάλογα με το σάκχαρο που συμμετέχει διαφοροποιούνται και οι ιδιότητές τους (Andersen & Markham, 2006).



Εικόνα 4: Βασικός ανθρακικός σκελετός της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση και χημικές δομές των φλαβονοειδών

Τάξη των φλαβονοειδών	**Γενική χημική δομή** $R_{1,2,3}$: -OH ή -H	**Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή**	
Φλαβονόλες		κερκετίνη	
		καιμπφερόλη	
		μυρικετίνη	
Φλαβανόλες		(+)-κατεχίνη	
		(-)-επικατεχίνη	
		επιγαλλοκατεχίνη	
Φλαβόνες		λουτεολίνη	
		απιγενίνη	
		χρυσίνη	
Φλαβανόνες		ναριγενίνη	
Ισοφλαβόνες		γενιστεΐνη	
		ντετζεΐνη	
Ανθοκυανιδίνες		κυανιδίνη	
		δελφινιδίνη	

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες αποτελούν τα πιο χαρακτηρισμένα και άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα τρόφιμα. Οι πιο χαρακτηριστικές φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρικετίνη (Πίνακας 1). Συνήθως βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως Ο-γλυκοσίδια, τα οποία συνήθως είναι συνδεδεμένα με την υδροξυλική ομάδα στη θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου (δακτύλιος C) (Εικόνα 4). Ωστόσο τα σάκχαρα μπορεί να είναι συνδεδεμένα στις υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις 5, 7, 4΄, 3΄ και 5΄ στον βασικό ανθρακικό σκελετό (Εικόνα 4) (Crozier et al., 2006). Συσσωρεύονται κυρίως στους εξωτερικούς φυτικούς ιστούς (επιδερμίδα και φύλλα), γιατί η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al., 2004).

Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες αποτελούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών και υπάρχουν είτε ως μονομερή (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη) (Πίνακας 1) είτε ως πολυμερή, τις προανθοκυανιδίνες (Crozier et al., 2006). Ως μονομερή σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή δεν υπάρχουν ως γλυκοσυλιωμένες μορφές (Manach et al., 2004). Ακόμη δεν έχουν επίπεδη στερεοχημική δομή όπως τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, με τον Β αρωματικό δακτύλιο να βρίσκεται σε διαφορετικό επίπεδο από τους δύο υπόλοιπους (Crozier et al., 2006). Οι προανθοκυανιδίνες ονομάζονται και συμπυκνωμένες ταννίνες που είναι μια ετερογενής ως προς την χημική δομή και το μοριακό βάρος ομάδα ενώσεων, που αποτελείται από διμερή, ολιγομερή, πολυμερή μιας φλαβαν-3-όλης, όπως η κατεχίνη. Τα μονομερή συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον άνθρακα C4 και C8 (ή C6) των ενώσεων. Ονομάζονται προανθοκυανιδίνες γιατί κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες. Ο ακριβής μηχανισμός πολυμερισμού δεν είναι πλήρως κατανοητός, πιστεύεται όμως ότι πραγματοποιείται ως αυτόματη συμπύκνωση (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

Φλαβόνες

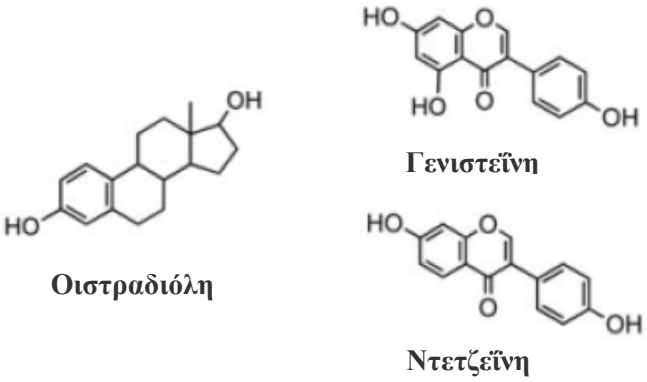
Οι φλαβόνες έχουν παρόμοια χημική δομή με τις φλαβονόλες και διαφέρουν στην απουσία υδροξυλικής ομάδας στον C3 του βασικού ανθρακικού σκελετού της δομής των φλαβονοειδών (Εικόνα 4, Πίνακας 1). Οι κυριότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στα φρούτα και τα λαχανικά είναι γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης (Πίνακας 1). Οι περισσότερες φλαβόνες υπάρχουν ως 7-Ο-γλυκοσίδια. Ωστόσο, οι υδροξυλομάδες μπορούν να μεθυλιωθούν ή να αλκυλιωθούν εκτός από τη σύνδεσή τους με σάκχαρα (Crozier et al., 2006). Οι πολυμεθοξυλιωμένες μορφές των φλαβονών είναι από τα πιο υδρόφοβα φλαβονοειδή (Manach et al., 2004).

Φλαβανόνες

Οι φλαβονόνες χαρακτηρίζονται από την απουσία του διπλού δεσμού ανάμεσα στους C2-C3 στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου (Πίνακας 1). Η χημική δομή τους επιτρέπει την σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες (Crozier et al., 2006). Συνήθως είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση 7 (Manach et al., 2004).

Ισοφλαβόνες

Στις ισοφλαβόνες, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή στην χημική τους δομή ο δεύτερος αρωματικός δακτύλιος (Β-δακτύλιος) είναι συνδεδεμένος με τον C3 παρά στον C2 του βασικού ανθρακικού σκελετού (Εικόνα 4) (Crozier et al., 2006). Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και κυρίως στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντετζεΐνης και γενιστεΐνης (Πίνακας 1). Χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα καθώς παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα, έχοντας την ικανότητα να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων. Διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 7 και 4΄ σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτές που περιέχονται στην οιστραδιόλη (Εικόνα 5), παρουσιάζοντας ψευδο-ορμονικές ιδιότητες (Manach et al., 2004).



Εικόνα 5: Χημικές δομές της οιστραδιόλης και δύο ισοφλαβονοειδών.

Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν την μη γλυκοσυλιωμένη μορφή των ανθοκυανινών. Η πιο συνηθισμένη ανθοκυανιδίνη είναι η κυανιδίνη (Πίνακας 1). Επειδή οι ανθοκυανιδίνες απουσία του σακχάρου είναι ασταθή μόρια, οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκονται στην γλυκοσυλιωμένη τους μορφή. Σταθεροποιούνται μέσω γλυκοσυλίωσης στη θέση 3, εστεροποίησης με διάφορα οργανικά και φαινολικά οξέα καθώς και μέσω σύνδεσης με άλλα φλαβονοειδή. Ανήκουν στα χρωμοφόρα φλαβονοειδή και βρίσκονται

σε διάφορες χημικές μορφές έγχρωμες και άχρωμες ανάλογα με το pH (Manach et al., 2004).

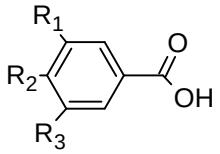
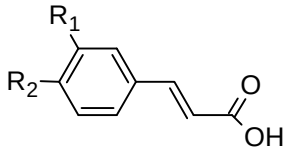
Μη Φλαβονοειδή

Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι απλούστερα στη δομή από τα φλαβονοειδή και αποτελούνται από έναν αρωματικό, βενζοϊκό δακτύλιο. Διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιννναμικά οξέα (C6-C3) τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως αντίστοιχα (Πίνακας 2). Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ, ενώ από τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Πίνακας 2) (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

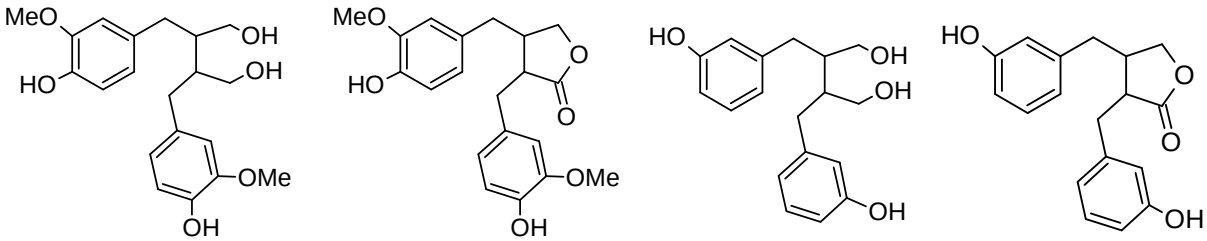
Τα κύρια παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων και ιδιαίτερα του γαλλικού και του ελλαγικού οξέος, αποτελούν οι υδρολυόμενες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι μία ετερογενής ομάδα πολυμερών ενώσεων, που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια υδροξυβενζοϊκών οξέων, κυρίως του γαλλικού οξέος. Το σάκχαρο είναι συνήθως η γλυκόζη. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι μικρότερα μόρια σε σχέση με τις συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες) και σε όξινες συνθήκες διαχωρίζονται πολύ εύκολα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα. Τα παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων δεν βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες σε εδώδιμα φυτά. Αντίθετα τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων, βρίσκονται σε πολλά τρόφιμα είτε ελεύθερα, είτε εστεροποιημένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα ή διάφορες αλκοόλες (Manach et al., 2004).

Πίνακας 2: Χημικές δομές των φαινολικών οξέων

Υδροξυβενζοϊκά οξέα			**Υδροξυκινναμικά οξέα**			
						
	Γαλλικό οξύ	**Πρωτοκατεχοϊκό οξύ**		**Κουμαρικό οξύ**	**Καφεϊκό οξύ**	**Φερουλικό οξύ**
R_1	OH	OH	R_1	OH	OH	OCH_3
R_2	OH	OH	R_2	-	OH	OH
R_3	OH	H				

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι διφαινυλικές ενώσεις που περιέχουν μία 2,3-διβενζυλβουτάνιο δομή, η οποία σχηματίζεται από διμερισμό δύο μόριων κινναμικού οξέος (Webb & McCullough, 2005). Οι λιγνάνες είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα. Οι κύριες φυτικές λιγνάνες είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, οι οποίες μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα στις λιγνάνες των θηλαστικών εντεροδιόλη και εντερολακτόνη αντίστοιχα (Εικόνα 6). Κύρια πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ωστόσο υπάρχουν και στα ψυχανθή, τα δημητριακά, τα φρούτα και τα λαχανικά (Manach et al., 2004).

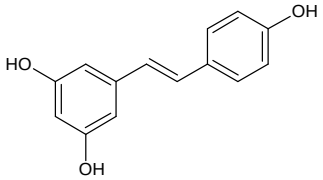


Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη **Ματιερσινόλη** **Εντεροδιόλη** **Εντερολακτόνη**

Εικόνα 6: Χημικές δομές της σεκοϊσολαρισιρεσινόλης και της ματαιρεσινόλης και των αντίστοιχων λιγνανών των θηλαστικών.

Στιλβένια

Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά την διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Η βασική τους χημική δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μία γέφυρα μεθυλενίου. Από τα πιο μελετημένα και πιο χαρακτηριστικά στιλβένια που βρίσκονται κυρίως στα σταφύλια είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη (Εικόνα 7). Τα στιλβένια διαφέρουν ως προς την θέση και τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με τους αρωματικούς δακτυλίους, ως προς τον βαθμό κατά τον οποίο οι ομάδες αυτές συνδέονται με σάκχαρα, μεθυλομάδες και μεθοξυλομάδες. Διαφέρουν ακόμη και ως προς τη στερεοχημική τους διαμόρφωση στο χώρο και ως προς την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις για τον σχηματισμό πολυμερών (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

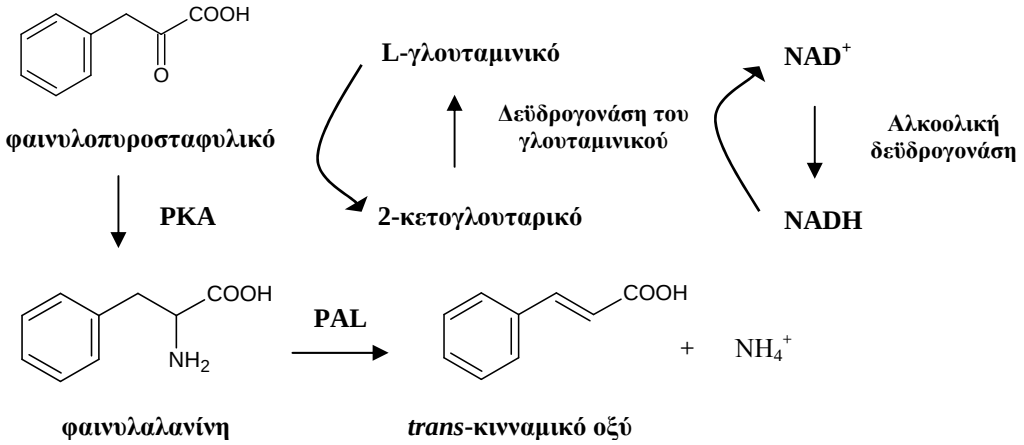


Εικόνα 7: Χημική δομή της *trans*-ρεσβερατρόλης.

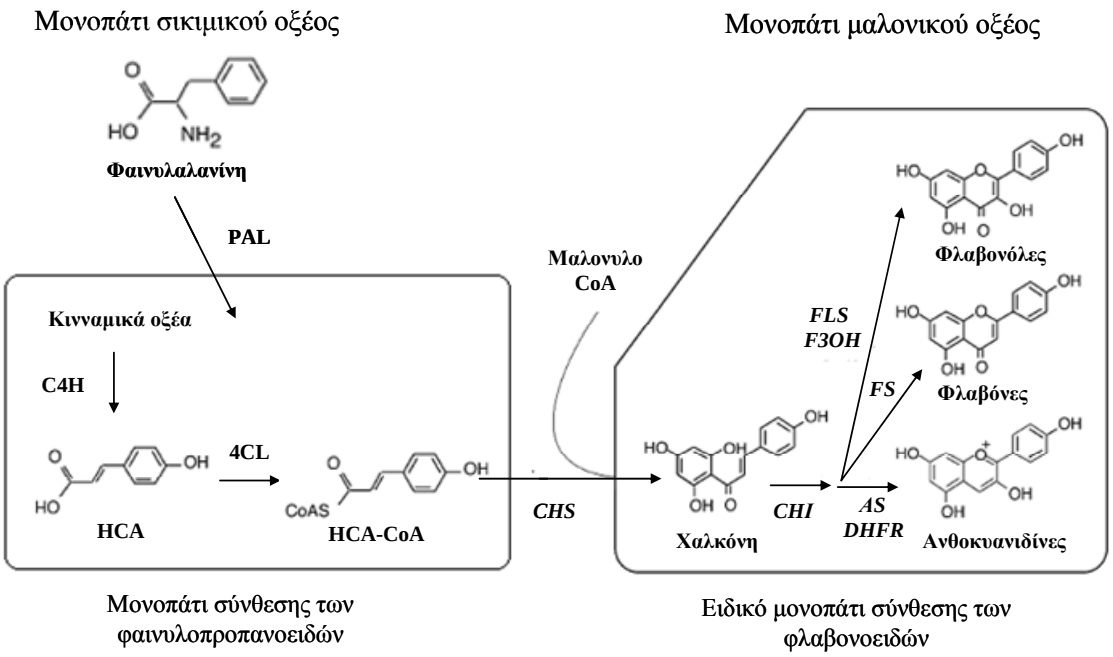
2.2.2. Βιοσύνθεση των πολυφαινολικών ενώσεων

Οι φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων οι οποίες βιοσυντίθενται με αρκετά διαφορετικές πορείες. Η βιοσύνθεση των πολυφαινολικών ενώσεων γίνεται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού και του μαλονικού οξέος (Crozier et al., 2006). Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων πολυφαινολικών ενώσεων καθώς προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης από τα οποία προκύπτουν οι πολυφαινόλες. Τα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) και τα φλαβονοειδή (C6-C3-C6) παράγονται από την φαινυλαλανίνη.

Το πρώτο στάδιο για την βιοσύνθεσή τους προϋποθέτει το σχηματισμό της φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφιλικό και τη μετατροπή της σε κινναμικό οξύ μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος (Εικόνα 8) (Soleas et al., 1997). Στην συνέχεια τα υδροξυκινναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή παράγονται μέσω του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλοπροπανοειδή και του ειδικού μονοπατιού για τα φλαβονοειδή αντίστοιχα (Εικόνα 9) (Crozier et al., 2006; Sakihama et al., 2002). Συνοπτικά για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών συμμετέχουν δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια (Εικόνα 9). Ο αρωματικός δακτύλιος Β και η γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου προέρχονται από την φαινυλαλανίνη μέσω του μονοπατιού σικιμικού οξέος ενώ ο αρωματικός δακτύλιος Α προέρχεται από το μονοπάτι του μαλονικού οξεός (Crozier et al., 2006). Τα στιλβένια όπως η *trans*-ρεσβερατρόλη παράγονται μέσω συμπύκνωσης ενός μορίου *p*-κουμάρυλο-CoA, που παράγεται από το γενικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών (Εικόνα 9) με τρία μόρια μαλόνυλο-CoA (Soleas et al., 1997).



Εικόνα 8: Μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Βιοσύνθεση της φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό μέσω της L-φαινυλαλανίνη-2-κετογλουταρικής αμινοτρανσφεράσης (PKA) η οποία γίνεται παρουσία του L-γλουταμινικού. Στη συνέχεια μέσω της λυάσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL) η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε *trans*-κινναμικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων.



Εικόνα 9: Βιοσύνθεση των πολυφαινολικών ενώσεων. Τα υδροξυκινναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή παράγονται από το κινναμικό οξύ (HCA) το οποίο παράγεται από την φαινυλλαλανίνη μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Το κινναμικό οξύ υδρολύεται από την υδροξυλάση του 4-κινναμικού (C-4-H) σε *p*-κουμαρικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε *p*-κουμαρυλ-CoA (HCA-CoA) από την 4-CoA λιγάση (4CL), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πολυφαινολικών οξέων. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με την συμπύκνωση του HCA-CoA με 3 μόρια μαλόνυλ-CoA, η οποία καταλύεται από την συνθετάση της χαλκόνης (CHS), η οποία μετατρέπεται σε διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες. CHI: ισομεράση της χαλκόνης, F3OH: υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης, AS: συνθετάση της ανθοκυανιδίνης, DHFR: ρεδουκτάση της δυϊδροφλαβονόλης, FLS: συνθετάση της φλαβονόλης.

2.2.3. Βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολισμός των πολυφαινολικών ενώσεων

Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις έχει συνδεθεί με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία και ιδιαίτερα απέναντι στον καρκίνο και στις καρδιαγγειακές παθήσεις (Scalbert et al., 2005; Arts & Hollman, 2005; Fresco et al., 2006; Manach et al., 2005). Για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων των πολυφαινολικών ενώσεων στις οποίες μπορεί να οφείλονται οι ευεργετικές ιδιότητες των τροφίμων εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι και πειραματικά μοντέλα *in vitro* και στη συνέχεια μελετώνται οι επιδράσεις τους *in vivo*. Ωστόσο για την καλύτερη και αρτιότερη κατανόηση των βιολογικών ιδιοτήτων των διατροφικών πολυφαινολικών ενώσεων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της συνολικής πρόσληψης πολυφαινολικών ενώσεων από τα τρόφιμα, της βιοδιαθεσιμότητάς τους καθώς και του μεταβολισμού τους από τον οργανισμό (Serrano et al., 2007; Fraga, 2007).

Παρόλα αυτά, πολύ λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τη συνολική ημερίσια πρόσληψη πολυφαινολών. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει ως τώρα, αφορούν κυρίως την πρόσληψη μεμονωμένων πολυφαινολικών ενώσεων όπως είναι οι φλαβονόλες (Crozier et al., 2000; Manach et al., 2005), οι φλαβανόνες (Manach et al., 2003, 2005), οι κατεχίνες (Higdon & Frei, 2003; Pascual-Teresa et al., 2000) και τα φαινολικά οξέα (Scalbert & Williamson, 2000; Manach et al., 2005). Παρόλα αυτά, υπάρχουν έρευνες που έχουν δείξει ότι η μέση ημερίσια πρόσληψη πολυφαινολικών ενώσεων μετά από καθημερινή διατροφή σε φυτικές τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι περίπου 1 gr (Kuhnau, 1976; Scalbert & Williamson, 2000; Williamson & Manach, 2005). Τα 2/3 αυτής της ημερήσιας πρόσληψης θεωρείται ότι είναι φλαβονοειδή και το 1/3 πολυφαινολικά οξέα (Scalbert & Williamson, 2000).

Η πολύ μεγάλη ποικιλία των πολυφαινολικών ενώσεων καθώς και των τροφίμων στα οποία υπάρχουν και οι διαφορετικές διατροφικές συνήθειες καθιστούν πολύ δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό της συνολικής πρόσληψης των πολυφαινολών. Ακόμη, ποικίλοι παράγοντες όπως γενετικοί, περιβαλλοντικοί καθώς και η επεξεργασία των τροφίμων επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στα τρόφιμα (Manach et al., 2004; Scalbert & Williamson, 2000; Hollman & Katan, 1999). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια προσδιορισμού της συνολικής πρόσληψης πολυφαινολικών ενώσεων από τη διατροφή είτε με τη χρήση μοντέλων βιοδιαθεσιμότητας (Saura-Calixto et al., 2007) είτε με την εκτενέστερη μελέτη της πρόσληψης πολυφαινολικών ενώσεων από επιμέρους τρόφιμα ενός συγκεκριμένου μοντέλου διατροφής όπως είναι η ελληνική και γενικότερα η Μεσογειακή διατροφή (Vasilopoulou et al., 2005; Simopoulos, 2001; Kalogeropoulos et al., 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων εξαρτώνται από τον τρόπο και το βαθμό μεταβολισμού τους στον οργανισμό. Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το ποσό ενός διατροφικού συστατικού που μεταφέρεται στην κυκλοφορία, ανέπαφο χημικά (Saura-Calixto et al., 2007). Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολικών ενώσεων συνδέεται με το μεταβολισμό τους, ο οποίος γίνεται μέσω του μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, φαρμάκων και άλλων ενώσεων (Williamson & Manach, 2005; Scalbert & Williamson, 2000). Η απορρόφηση των πολυφαινολών γίνεται κυρίως μέσω παθητικής διάχυσης στο έντερο. Ωστόσο η χημική δομή τους επηρεάζει το ρυθμό και την έκταση της απορρόφησής τους από το έντερο, τις αντιδράσεις σύζευξης με μεθυλικές, γλυκουρονικές

και θειικές ομάδες, καθώς και την φύση των μεταβολιτών τους που κυκλοφορούν στο πλάσμα (Scalbert & Williamson, 2000; Crozier et al., 2009).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι συνήθως γλυκοσυλιωμένες ή με την μορφή πολυμερών και δεν μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό σε αυτή τη μορφή. Το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού τους είναι η απομάκρυνση του σακχάρου, που είναι υδρόφιλο, ώστε να είναι εφικτή η απορρόφησή τους. Η απομάκρυνση των σακχάρων δεν συμβαίνει από τα ένζυμα του στομάχου αλλά από εντερικά ένζυμα όπως είναι τις *β*-γλυκοσιδάσες ή *α*-ραμνοσιδάσες καθώς και από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Manach et al., 2004; Yang et al., 2001). Εξαίρεση αποτελούν οι ανθοκυανίνες, στις οποίες επειδή η μη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή είναι ασταθής, η μορφή που έχουν μέσα στον οργανισμό είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή (Manach et al., 2004; Walle, 2004).

Οι πολυμερείς πολυφαινόλες, όπως είναι οι ταννίνες, επειδή έχουν μεγάλο μοριακό βάρος δεν απορροφούνται εύκολα. Κάτω από τις όξινες συνθήκες του στομάχου ή από την μικροχλωρίδα του εντέρου υδρολύονται σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους που είναι ευκολότερο να απορροφηθούν (Scalbert & Williamson, 2000). Εξαίρεση αποτελούν οι προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες), οι οποίες επειδή είναι από τις πιο άφθονες πολυφαινόλες στα τρόφιμα απορροφούνται σε πολύ μικρό βαθμό. Έχει βρεθεί ότι *in vivo,* απορροφώνται μόνο διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες στο λεπτό έντερο γιατί ενώ θα μπορούσαν να υδρολυθούν σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους κάτω από τις όξινες συνθήκες του στομάχου, οι προανθοκυανιδίνες είναι ανθεκτικές στις συνθήκες αυτές (Manach et al., 2004; Cos et al, 2003). Τα φαινολικά οξέα, όταν βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους απορροφώνται πολύ γρήγορα από το λεπτό έντερο. Ωστόσο τα φαινολικά οξέα είναι συνήθως εστεροποιημένα στα τρόφιμα και αυτό μειώνει την απορρόφησή τους. Οι ανθρώπινοι ιστοί (βλενογόνος του λεπτού εντέρου, ήπαρ) και τα βιολογικά υγρά (πλάσμα, γαστρικό υγρό) δεν περιέχουν ένζυμα τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν αυτή την υδρόλυση. Αυτό γίνεται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται στην εντερική μικροχλωρίδα (Scalbert & Williamson, 2000; Manach et al., 2004).

Όσες πολυφαινόλες δεν απορροφήθηκαν στο στομάχι ή στο λεπτό έντερο φτάνουν στο παχύ έντερο. Εκεί φτάνουν και οι πολυφαινόλες που απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ και εκκρίνονται στην χολή ή από τα εντεροκύτταρα πάλι πίσω στο λεπτό έντερο, με διαφορετική όμως δομή, για παράδειγμα με την μορφή γλυκουρονιδίου. Η εντερική μικροχλωρίδα απομακρύνει τα σάκχαρα και τις πρόσθετες ομάδες από τις πολυφαινόλες φέροντας ισχυρά υδρολυτικά ένζυμα και τις μετατρέπει σε

απλούστερα οργανικά οξέα τα οποία στην συνέχεια απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ (Scalbert & Williamson, 2000; Kroon et al., 2004). Κατά την πορεία της απορρόφησής τους οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται από τα ένζυμα της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ. Τα ένζυμα αυτά που είναι κυρίως οι κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες (COMT), γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες (UDP) και οι σουλφοτρανσφεράσες (SULT) οι οποίες προσθέτουν μεθυλικές, γλυκουρονικές και θειικές ομάδες αντίστοιχα (Kroon et al., 2004; Manach et al., 2004; Yang et al., 2001).

Από το μονοπάτι μεταβολισμού των πολυφαινολών φαίνεται ότι στο αίμα έχουν τις υποκατεστημένες μορφές τους, τους μεταβολίτες τους και ορισμένες φορές τις ελεύθερες μορφές τους. Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό σχήμα, πολικότητα, ιονική ισχύ σε σχέση με την αρχική πολυφαινόλη (Kroon et al., 2004; Rechner et al., 2001). Ακόμη, μόνο για ορισμένες διατροφικές πολυφαινόλες έχουν μελετηθεί ο μεταβολισμός και η βιοδιαθεσιμότητά τους *in vivo* (Williamson & Manach, 2005; Rechner et al., 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά τα επίπεδα μιας πολυφαινολικής ένωσης στο πλάσμα δεν ξεπερνούν το 1 μΜ μετά από την κατανάλωση 10-100 mg της ένωσης αυτής (Scalbert & Williamson, 2000).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η βιοδιαθεσιμότητα, ο μεταβολισμός των πολυφαινολικών ενώσεων, οι ιδιότητες των μεταβολιτών τους και η συγκέντρωσή τους στον οργανισμό αποτελούν σημαντικά θέματα τα οποία είναι απαραίτητα να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό. Τα στοιχεία αυτά είναι απαραίτητα για την καλύτερη εκτίμηση των *in vivo* βιολογικών ιδιοτήτων των πολυφαινολικών ενώσεων σε σχέση με τις *in vitro* ιδιότητές τους.

2.3. Πολυφαινολικές ενώσεις στα ψυχανθή

Τα ψυχανθή εκτός από τη σημαντική θρεπτική διατροφική αξία που έχουν λόγω της μεγάλης περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, αποτελούν και πολύ σημαντική πηγή πολυφαινολικών ενώσεων που σχετίζονται με τις ευεργετικές επιδράσεις που παρουσιάζουν στην υγεία (Messina et al., 1999; Rochfort & Panozzo, 2007; Kris-Etherton et al., 2002). Ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία περισσότερες από 100 μελέτες έχουν εξετάσει την περιεκτικότητα των ψυχανθών σε πολυφαινολικές και άλλες βιοδραστικές ενώσεις καθώς και στις ιδιότητές τους (Amarowicz & Pegg, 2008). Οι περισσότερες έρευνες που αφορούν την ταυτοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων στα ψυχανθή, έχουν γίνει στα σπέρματα και τους καρπούς των ψυχανθών (Amarowicz & Pegg, 2008; Xu et al., 2007; Mazur et al., 1998).

Τα ψυχανθή αποτελούν την κυριότερη πηγή των φυτοοιστρογόνων (Mathers, 2002; Campos-Vega et al., 2009). Οι κυριότερες πολυφαινολικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί σε διάφορα ψυχανθή είναι φλαβονοειδή και γλυκοσίδιά τους, όπως καιμπφερόλη, κερκετίνη, ανθοκυανιδίνες και ιδιαίτερα ισοφλαβονών καθώς και φαινολικών οξέων και λιγνανών (Mazur et al., 1998; Campos-Vega et al., 2009; Lin & Lai, 2006).

Ωστόσο υπάρχει ποικιλομορφία των πολυφαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στις διαφορετικές ποικιλίες ψυχανθών και στα διαφορετικά τμήματα των φυτών (Xu et al., 2007; Amarowicz & Pegg, 2008). Η πιο μεγάλη περιεκτικότητα πολυφαινολικών ενώσεων εντοπίζεται κυρίως στα περικάρπια των ψυχανθών (Amarowicz & Pegg, 2008). Ακόμη, η σύσταση των ψυχανθών σε πολυφαινολικές ενώσεις αλλάζει μετά από την επεξεργασία που υπόκεινται τα περισσότερα ψυχανθή (π.χ. φούσκωμα, βράσιμο) πριν από την κατανάλωσή τους (Xu & Chang, 2008; Kalogeropoulos et al., 2010; Crozier, 2009; Amarowicz & Pegg, 2008). Ακόμη και τα στάδια ωρίμανσης και ανάπτυξης των ψυχανθών επηρεάζουν την πολυφαινολική τους σύσταση (Lin & Lai, 2006; Amarowicz & Pegg, 2008; López-Amorós, 2006) και τη διατροφική τους αξία (Vidal-Valverde et al., 2002).

2.3.1. Φυτοοιστρογόνα

Ο όρος φυτοοιστρογόνα χρησιμοποιείται για να περιγράψει ενώσεις φυτικής προέλευσης που έχουν παρόμοιες ιδιότητες βιολογικής απόκρισης με τα οιστρογόνα (Murphy & Hendrich, 2002; Kurzer & Xu, 1997). Τα φυτοοιστρογόνα είναι συνήθως διφαινολικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και δρουν ως μερικοί αγωνιστές ή ανταγωνιστές των οιστρογόνων, έχοντας όμοιες ή

αντίθετες δράσεις με τα οιστρογόνα (Setchell, 1998; Kris-Etherton et al., 2002). Απαρτίζονται από τρεις ομάδες ενώσεων τις ισοφλαβόνες, τις κουμεστάνες και τις λιγνάνες (Murphy & Hendrich, 2002; Setchell, 1998). Η οικογένεια των φυτών *Leguminosae*/*Fabacae* θεωρείται η σημαντικότερη πηγή φυτοοιστρογόνων (Mazur et al., 1998; Dixon & Summer, 2003). Βρίσκονται είτε στα υπέργεια τμήματα των φυτών είτε στα σπέρματα. Τα ψυχανθή και ιδιαίτερα η σόγια θεωρούνται οι σημαντικότερες πηγές ισοφλαβονών (ντετζεΐνη, γενιστεΐνη) και λιγνανών (Murphy & Hendrich, 2002; Messina, 1999; Mazur et al., 1998). Για διάφορες ποικιλίες σπερμάτων φασολιών (*Phaseolus vulgaris*), φακής (*Lens culinaris*) και ιδιαίτερα της σόγιας (*Glycine max*) έχει προσδιοριστεί η υψηλή περιεκτικότητά τους σε φυτοοιστρογόνα (Mazur et al., 1998).

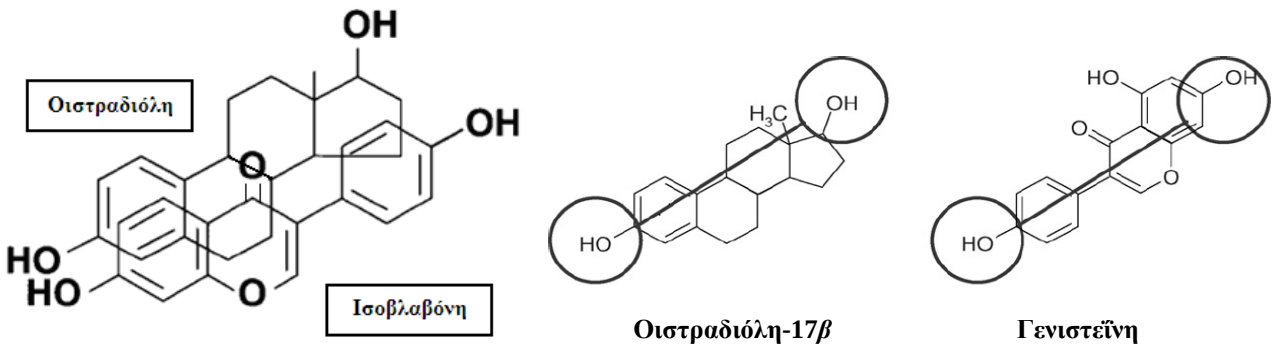
Υψηλή κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα έχει συσχετιστεί με ευεργετικές επιδράσεις σε ορμονοεξαρτώμενες ασθένειες, διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. προστάτη, εντέρου, μαστού) αλλά και σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Humfrey, 1998; Usui, 2006; Park et al., 2005; Adlercreutz et al., 2004). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τις ευεργετικές ιδιότητες των φυτοοιστρογόνων αφορούν κυρίως τη σόγια η οποία θεωρείται και η σημαντικότερη πηγή τους (Murphy & Hendrich, 2002; Usui, 2006). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την υψηλή κατανάλωση σόγιας με ευεργετικές επιδράσεις στον καρκίνο του προστάτη και του μαστού, στα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης, στην οστεοπόρωση, το διαβήτη και την παχυσαρκία (Branca & Lorenzetti, 2005; Cederroth & Nef, 2009; Humfrey, 1998). Η κατανάλωση σόγιας έχει επίσης συνδεθεί και με μειωμένα επίπεδα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και αθηροσκλήρωσης (Humfrey, 1998; Sirtori, 2001).

Ισοφλαβόνες

Η οικογένεια των φυτών *Leguminosae*/*Fabacae* αποτελούν την κυριότερη πηγή ισοφλαβονών. Οι ισοφλαβόνες και ιδιαίτερα η γενιστεΐνη και η ντετζεΐνη, είναι τα πιο μελετημένα φυτοοιστρογόνα (Dixon & Ferreira, 2002). Η σόγια περιέχει τις μεγαλύτερες ποσότητες ντετζεΐνης (47 mg/100g) και γενιστεΐνης (74 mg/100g) σε σχέση με άλλα ψυχανθή. Τα ρεβίθια περιέχουν ντετζεΐνη και γενιστεΐνη σε ποσό 0,04 mg/100g και 0,06 mg/100g αντίστοιχα, ενώ οι φακές δεν περιέχουν σημαντικές ποσότητες ισοφλαβονών (Campos-Vega, 2010; Murphy & Hendrich, 2002). Ακόμη, μελέτες που έχουν γίνει σε λούπινα έχουν δείξει ότι έχουν μεγάλη περιεκτικότητα ισοφλαβονών στους σπόρους και στα περικάρπιά τους (Campos-Vega, 2010).

Στις ισοφλαβόνες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις. Η πιο χαρακτηριστική είναι ότι παρουσιάζουν σημαντική δομική ομοιότητα με τα οιστρογόνα (Εικόνα 10). Συναγωνίζονται ή ανταγωνίζονται με τα ενδογενή οιστρογόνα στη σύνδεσή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς, με αποτέλεσμα να προκαλούν ασθενείς αποκρίσεις όμοιες με αυτές που προκαλούν τα οιστρογόνα (Kris-Etherton, 2002; Setchell & Cassidi 1999). Χαρακτηριστική είναι η δομική ομοιότητα της γενιστεΐνης με την οιστραδιόλη-17*β*. Στη γενιστεΐνη και την οιστραδιόλη-17*β* οι ενδομοριακές αποστάσεις ανάμεσα στις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στα άκρα των μορίων είναι σχεδόν πανομοιότυπες (Εικόνα 10). Αυτές οι ομοιότητες είναι σημαντικές για την σύνδεση των ισοφλαβονών στους οιστρογονικούς υποδοχείς ER που συνδέεται η οιστραδιόλη (Wuttke, et al., 2007; Murphy & Hendrich, 2002).

Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα δύο υπότυποι των υποδοχέων ER, οι ER*α* και ER*β*. Η γενιστεΐνη έχει παρατηθεί ότι έχει ασθενή οιστρογονική δράση καθώς παρουσιάζει πολύ μικρή συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα ER*α* σε σχέση με τα φυσιολογικά οιστρογόνα. Ωστόσο, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι συνδέεται στον υποδοχέα ER*β* με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης. Γενικά, λόγω της διαφορετικής κατανομής των υποδοχέων ER*α* και ER*β* στους ιστούς, η γενιστεΐνη έχει προταθεί ότι δρα ως αγωνιστής στον ER*β* υποδοχέα και μερικός αγωνιστής στον ER*α* (Barnes et al., 2000). Ο υποδοχέας ER*α* σχετίζεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ, σε ορισμένους ιστούς ο ER*β* σχετίζεται με τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ιστών. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση των φυτοοιστρογόνων με τους υποδοχείς ER σχετίζεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες που έχουν αποδοθείς στις ισοφλαβόνες (Wuttke, et al., 2007; Murphy & Hendrich, 2002).



Εικόνα 10: Δομική ομοιότητα των ισοφλαβονών με τα οιστρογόνα.

Οι ευεργετικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στην κατανάλωση σόγιας θεωρείται ότι οφείλονται κυρίως στις ισοφλαβόνες (Setchell, 1998). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ισοφλαβόνες έχουν προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στον καρκίνο του μαστού (Adlercreutz, 2003) και του προστάτη (Watanabe et al., 2002; Magee & Rowland, 2004) και έχουν ευεργετικές επιδράσεις απέναντι στις καρδιαγγειακές παθήσεις καθώς και σε γυναικολογικά προβλήματα (Watanabe et al., 2002; Setchell, 1999; Barnes et al., 2000).

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, έχει δείξει ότι έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες που καθιστούν τις ισοφλαβόνες ως παράγοντες που μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και του προστάτη. Η ανάπτυξη των καρκινικών προστατικών κύτταρών εξαρτάται και επάγεται από την τεστοστερόνη η παραγωγή της οποίας αναστέλλεται από την οιστραδιόλη. Όταν τα επίπεδα της φυσικής οιστραδιόλης είναι χαμηλά, οι ισοφλαβόνες έχουν την ιδιότητα να μειώνουν τα επίπεδα των ανδρογόνων και να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού είναι εξαρτώμενα ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια από τα οιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα εμποδίζοντας τη διαθεσιμότητά τους και αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Crozier et al., 2006; Magee & Rowland, 2004).

Εκτός από την συναγωνιστική ανταγωνιστική δράση των ισοφλαβονών με τα οιστρογόνα, που θεωρείται ο κύριος λόγος που δρουν προστατευτικά σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους, οι ισοφλαβόνες έχουν και άλλες ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες. Η γενιστεΐνη έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Zielonka et al., 2003), αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Kerry & Abbey, 1998), επάγει την απόπτωση (Zhou & Lee, 1998), επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια και αναστέλλει την αγγειογένεση (Sarkar & Li, 2002).

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες ανήκουν και αυτές στα φυτοοιστρογόνα ωστόσο, έχουν ηπιότερη οιστρογονική και αντιοιστρογονική δράση σε σχέση με τα ισοφλαβονοειδή (Kris-Etherton, 2002). Σε αντίθεση με τις ισοφλαβόνες, οι λιγνάνες είναι ενώσεις που βρίσκονται σε μεγαλύτερο εύρος φυτών. Όσον αφορά τα ψυχανθή, έχουν εντοπιστεί σε όλα τα είδη φασολιών, στις φακές και τα μπιζέλια και η περιεκτικότητα τους σε λιγνάνες κυμαίνεται από 0-240 g/100g ξηρού βάρους (Campos-Vega, 2010; Mazur et al., 1998; Murphy & Hendrich, 2002).

Και οι λιγνάνες συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του εντέρου (Webb & McCullough, 2005; Aldercreutz, 2002). Η ομοιότητα των λιγνανών και των μεταβολιτών τους (εντεροδιόλη και εντερολακτόνη) με τα οιστρογόνα, λόγω της διφαινολικής τους δομής, τους προσδίδει την ικανότητα να συνδέονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων ER και να έχουν επιδράσεις αντίστοιχες με εκείνες που έχουν και οι ισοφλαβόνες (Murphy & Hendrich, 2002; Webb & McCullough, 2005). Η προστατευτική τους δράση αποδίδεται στην αντιοιστρογονική τους δράση, στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την αγγειογένεση και να επάγουν την απόπτωση καθώς και στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Webb & McCullough, 2005).

2.3.2. Φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα

Παρά τη μεγάλη περιεκτικότητα των ψυχανθών σε ισοφλαβονοειδή και λιγνάνες στα ψυχανθή έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα φλαβονοειδή καθώς και φαινολικά οξέα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πράσινα φασολάκια (*Phaseolus vulgaris*) και οι φακές (*Lens culinaris*) αποτελούν μια από τις σημαντικότερες εβδομαδιαίες πηγές φλαβονών (απιγενίνη και λουτεολίνη) και φλαβονολών (κερκετίνη, καιμπφερόλη, μυρικετίνη και ισοραμνεντίνη) μιας τυπικής Μεσογειακής διατροφής (Vasilopoulou et al., 2005).

Τα φαινολικά οξέα που έχουν εντοπιστεί σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καρπούς ψυχανθών είναι το φερουλικό, το *p*-κουμαρικό, το *o*-κουμαρικό, το σιναπικό, το καφεϊκό, το πρωτοκατεχοϊκό, το βανιλικό και το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Kalogeropoulos et al., 2010; Campos-Vega et al., 2009).

Οι περισσότερες έρευνες που αφορούν την ταυτοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων στα ψυχανθή, έχουν γίνει στα σπέρματα και τους καρπούς τους. Τα συχνότερα μελετημένα είδη είναι αυτά των κοινών φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) της φακής (*Lens culinaris*) και των μπιζελιών (*Pisum sativum*) τα οποία αποτελούνται από πολλές ποικιλίες και διαφέρουν στο σχήμα, χρώμα και μέγεθος του καρπού. Στα περικάρπια και στους καρπούς διαφόρων ποικιλιών φασολιών του είδους *Phaseolus vulgaris* καθώς και σε διάφορα εκχυλίσματά τους έχουν εντοπιστεί φλαβονοειδή όπως γλυκοσυλιωμένες μορφές φλαβανολών, ανθοκυανιδίνες (Choung et al., 2003) και συμπυκνωμένες ταννίνες (Aparicio-Fernandez et al., 2005; Beninger & Hosfield, 2003; Díaz-Batalla et al., 2006; Oomah et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί πολλές πολυφαινολικές ενώσεις στους καρπούς και στα περικάρπια της φακής (*Lens culinaris*) (Fernandez-Orozco et al., 2003; Amarowicz et al., 1995; Dueñas et al., 2002) των μπιζελιών (*Pisum sativum*) (Dueñas et al., 2004) και της φάβας (*Lathyrus sativus*) (Korus et al., 2002; Pastor-

Cavada et al., 2009). Ο αριθμός των εργασιών οι οποίες ταυτοποιούν και απομονώνουν πολυφαινολικές ενώσεις σε διάφορα τμήματα, εκτός των καρπών, και σε διάφορες τοπικές ποικιλίες, εδώδιμων και μη, ψυχανθών συνεχώς αυξάνεται.

2.4. Αντιδιατροφικοί παράγοντες στα ψυχανθή

Στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στα όσπρια έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες ουσίες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αντιδιατροφικοί παράγοντες. Οι ενώσεις αυτές είναι μόρια τα οποία έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων και είναι αποτέλεσμα της εξελικτικής προσαρμογής των φυτών σε αντίξοες συνθήκες (Duranti & Gius, 1997). Οι κυριότεροι αντιδιατροφικοί παράγοντες που έχουν εντοπιστεί στα ψυχανθή είναι οι αναστολείς υδρολυτικών ενζύμων, οι λεκτίνες, το φυτικό οξύ, οι σαπωνίνες, τα αλκαλοειδή, οι ολιγοσακχαρίτες και οι ταννίνες (Campos-Vega et al., 2009; Champ, 2002; Παπακώστα, 2005). Παρά τις δυσμενείς επιδράσεις και οι αντιδιατροφικοί παράγοντες κατατάσσονται στις βιοδραστικές ενώσεις έχοντας ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία (Campos-Vega et al., 2009; Champ, 2002; Thompson, 1993).

Αναστολείς υδρολυτικών ενζύμων

Οι κυριότεροι αναστολείς υδρολυτικών ενζύμων που έχουν εντοπιστεί στα όσπρια είναι κυρίως οι αναστολείς πρωτεασών, ιδιαίτερα της τρυψίνης και της α-αμυλάσης (Campos-Vega et al., 2009). Τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*) αποτελούν τη δεύτερη σημαντική φυσική πηγή α-αμυλασών μετά τα σιτηρά (Lajolo et al., 1991). Οι ενζυμικοί αυτοί αναστολείς εμποδίζουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και περιορίζουν την πέψη οδηγώντας σε προβλήματα. Ωστόσο οι επιβλαβείς επιδράσεις τους εκδηλώνονται όταν οι σπόροι ή άλλα προϊόντα των ψυχανθών καταναλώνονται χωρίς να προηγηθεί μαγείρεμα. Είναι ευπαθείς σε υψηλές θερμοκρασίες και αδρανοποιούνται. Μετά την αδρανοποίησή τους οι αναστολείς έχουν υψηλή θρεπτική αξία λόγω της υψηλότερης, σε σχέση με τις αποθηκευτικές πρωτεΐνες, περιεκτικότητας σε θειούχα αμινοξέα (Lajolo & Genovese, 2002). Παρά τις αρνητικές επιδράσεις οι αναστολείς υδρολυτικών ενζύμων που υπάρχουν στα ψυχανθή έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες και μπορούν να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στο διαβήτη και στην παχυσαρκία (Champ, 2002; Thompson, 1993).

Λεκτίνες

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με σάκχαρα και αιμοσυγκολλητίνες. Έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την απορρόφηση των πρωτεϊνών και άλλων θρεπτικών συστατικών επηρεάζοντας τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και την εντερική μικροχλωρίδα (Campos-Vega, 2010; Vasconcelos & Oliveira, 2004). Ωστόσο, όμοια με τους αναστολείς ενζύμων αδρανοποιούνται από τις υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι επιβλαβείς επιδράσεις τους (Lajolo & Genovese, 2002). Παρά τις αρνητικές επιδράσεις που παρουσιάζουν οι λεκτίνες, έχει παρατηρηθεί από *in vitro* πειράματα ότι εμφάνισαν αντικαρκινικές ιδιότητες μειώνοντας την ανάπτυξη και εμποδίζοντας τον καρκινικό φαινότυπο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Campos-Vega, 2010; Champ, 2002).

Φυτικό οξύ

Το φυτικό οξύ αποτελεί μία από τις πιο κοινές ενώσεις που υπάρχουν στα φυτά και ιδιαίτερα στα ψυχανθή (Campos-Vega, 2010; Champ, 2002). Αποτελείται από μια ινοσιτόλη συνδεδεμένη με έξι φωσφορικές ομάδες. Έχει την ικανότητα να μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα μετάλλων με σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως του Fe, Mg, Zn κ.α. δημιουργώντας σύμπλοκα τα οποία είναι λιγότερο διαθέσιμα για πέψη και απορρόφηση από το έντερο (Campos-Vega, 2010; Sandberg, 2002; Cheryan, 1980). Ωστόσο *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το φυτικό οξύ παρουσιάζει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο προστατευτικές όσο και θεραπευτικές (Campos-Vega, 2010; Champ, 2002; Thompson, 1993). Ακόμη παρουσιάζει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες κυρίως εξαιτίας της ικανότητάς του να δεσμεύει χηλικά τα μέταλλα Fe και Cu (Minihave & Rimbach, 2002).

Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενώσεων οι οποίες αποτελούνται από ένα τριτερπένιο ή ένα στεροειδές για πυρήνα και ένα ή περισσότερα σάκχαρα συνδεδεμένα σε αυτό τον πυρήνα (Rochfort & Panozzo, 2007; Milgate & Roberts, 1995). Οι σαπωνίνες είναι πολύ γνωστοί για την τοξικότητά τους και την ικανότητά τους να προκαλούν λύση στα ερυθροκύτταρα καθώς και σε άλλα κύτταρα. Ωστόσο, εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας που παρουσιάζουν ο αριθμός των τοξικών σαπωνίνων στα ψυχανθή είναι περιορισμένος (Shi et al., 2004). Έχουν εντοπιστεί σε πολλά ψυχανθή σε λούπινα, φακές, φασόλια, μπιζέλια και κουκιά (Campos-Vega, 2010). Παρά τις

αρνητικές τους επιδράσεις οι σαπωνίνες των ψυχανθών έχει παρατηρηθεί ότι έχουν ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία. Μηχανιστικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι σαπωνίνες των ψυχανθών έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες (Shi et al., 2004; Chang et al., 2006; Milgate & Roberts, 1995; Thompson, 1993). Ακόμη έχουν ευεργετικές ιδιότητες απέναντι στην υπερλιπιδαιμία και προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις (Shi et al., 2004; Geil & Anderson, 1994).

Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι ουσίες υπεύθυνες για την πικρή γεύση και την τοξικότητα ορισμένων ψυχανθών. Εξαιτίας της διαλυτότητάς τους στο νερό οι επιβλαβείς επιδράσεις τους περιορίζονται από το «φούσκωμα» των οσπρίων σε νερό και το βράσιμό τους. Η πλειοψηφία των αλκαλοειδών εντοπίζεται κυρίως στα λούπινα (Rochfort & Panozzo, 2007). Παρόλα αυτά, τα αλκαλοειδή έχουν και κάποιες προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στον καρκίνο (Reddy et al., 2003).

Ολιγοσακχαρίτες

Τα ψυχανθή είναι γνωστό ότι οδηγούν στη δημιουργία αερίων στο έντερο τα οποία οφείλονται στην παρουσία των ολιγοσακχαριτών (Campos-Vega, 2010; Παπακώστα, 2005). Στα ψυχανθή οι ολιγοσακχαρίτες βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις ωστόσο η περιεκτικότητά τους διαφέρει ανάμεσα στα είδη (Saini, 1989). Είναι ενώσεις στις οποίες ένα ή τρία μόρια γλυκόζης τα οποία ενώνονται με έναν *α*(1-6)-δεσμό με τη γλυκόζη μιας σακχαρόζης. Η δημιουργία αερίων οφείλεται στην αδυναμία πέψης αυτών των ολιγοσακχαριτών εξαιτίας της απουσίας της α-γαλακτοσιδάσης στο βλενογόννο του εντέρου και στη συνέχεια στην αποδόμηση τους από τα βακτήρια του παχέος έντερο μέσω ζύμωσης που οδηγεί στην παραγωγή CO_2 και H_2 (Campos-Vega, 2010; Saini & Knights, 1984). Ωστόσο παρά τις αρνητικές τους επιδράσεις, οι ολιγοσακχαρίτες έχουν συσχετιστεί με ευεργετικές επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα (Rochfort & Panozzo, 2007).

Ταννίνες

Οι ταννίνες όπως προαναφέρθηκε είναι πολυμερείς πολυφαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και διακρίνονται σε υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους δεν απορροφώνται από τον οργανισμό εξαιτίας των ισχυρών δεσμών που συνδέουν τα μονομερή τους

στοιχεία (Manach et al., 2004; Reed et al., 1995). Σχετίζονται με το χρώμα των σπόρων των οσπρίων και πιο συγκεκριμένα όσο πιο σκούρο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των οσπρίων σε ταννίνες (Deshpande & Campbell, 1992). Κατατάσσονται στους αντιδιατροφικούς παράγοντες των ψυχανθών γιατί μειώνουν τη θρεπτική τους αξία καθώς έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες και εμποδίζουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Bravo et al., 1993; Chung et al., 1998; Reed et al., 1995; Yoshida et al., 2000). Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι δεσμεύουν χηλικά μέταλλα εμποδίζοντας την απορρόφησή τους (Hill, 2003; Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

Παρά τις αρνητικές τους επιδράσεις, οι ταννίνες έχει προταθεί ότι έχουν αντικαρκινικές, αντιμεταλλαξιγόνες, αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Cos et al., 2003; Chung et al., 1998; Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται κυρίως στις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Hagerman et al., 1999; Cos et al., 2003). Οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες αποδίδονται στην ικανότητά τους να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες, να δεσμεύουν χηλικά ιόντα μετάλλων, να αναστέλλουν τη δράση προοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. λιποοξυγενάση) καθώς και στην ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Cos et al., 2003; Chung et al., 1998; Hagerman et al., 1999). Ακόμη έχουν αντιμικροβιακές και αντιικές ιδιότητες (Cos et al., 2003; Chung et al., 1998; Yoshida et al., 2000). Τόσο οι επιβλαβείς και οι ευεργετικές επιδράσεις που παρουσιάζουν οι ταννίνες εξαρτώνται από τη δομή τους αλλά και τη συγκέντρωσή τους (Chung et al., 1998; Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

3. Χημειοπροστασία

3.1. Γενικά

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, κάπνισμα, διατροφή, εργασιακό περιβάλλον) (Baer-Dubowska et al., 2006; De Flora & Ferguson, 2005). Με βάση τις επιδημιολογικές μελέτες ο Sporn για πρώτη φορά έθεσε τον όρο χημειοπροστασία του καρκίνου (Sporn, 1976). Χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσοτέρων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων (Sporn, 1976; Hong & Sporn, 1997; Kelloff et al., 2004). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που τη διέπουν, έδειξαν ότι υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al., 2004; Surch, 2003).

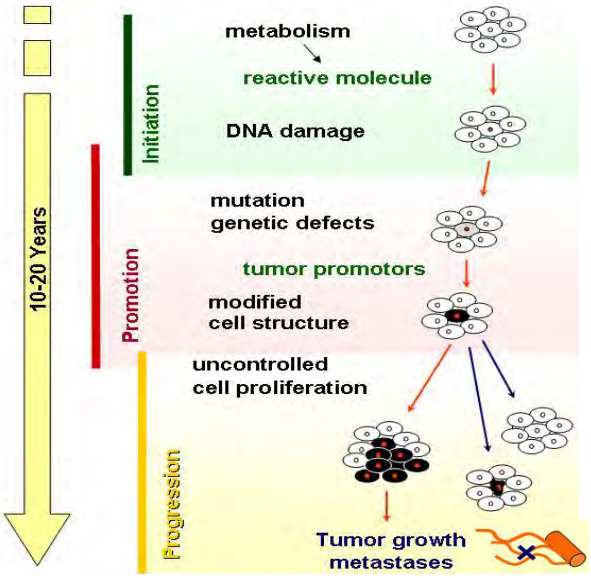
Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο, την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και την περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2000; Smith et al., 2005). Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών προσεγγίσεων: 1) μείωση της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα μέσω ελέγχου του εργασιακού περιβάλλοντος και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής, 2) εντοπισμό των πληθυσμιακών ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου λόγω γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, έτσι ώστε να γίνονται σε αυτούς συχνές κλινικές εξετάσεις και 3) εξασφάλιση της χημειοπροστασίας με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Από αυτές τις 3 προσεγγίσεις, πολύ σημαντική θεωρείται η χημειοπροστασία γιατί οι 2 πρώτες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση (Stoner et al., 1997; Shureiqi et al., 2000).

3.2. Κύρια στάδια της καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση είναι ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό μέσω μιας πολυδιάστατης διαδικασίας. Αιτίες του καρκίνου θεωρούνται διάφορα καρκινογόνα όπως οι ιοί, διάφορα χημικά και η ακτινοβολία καθώς και οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και οι αυθόρμητες

μεταλλάξεις. Τα γενικά στάδια τα οποία θεωρείται ότι ακολουθεί η καρκινογενετική διαδικασία είναι η έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η πρόοδος (progression) (Εικόνα 11) (Baer-Dubowska et al., 2006; Shureiqi et al., 2000).

Αρχικά, για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πραγματοποίηση μεταλλάξεων στο DNA. Στο στάδιο της έναρξης (initiation) συμβαίνει αντίδραση μεταξύ του καρκινογόνου και του DNA του κυττάρου, που οδηγεί στη δημιουργία μεταλλάξεων (Εικόνα 11). Το στάδιο αυτό είναι μη αντιστρεπτό, ωστόσο μόνο κάτω από κάποιες προϋποθέσεις μπορεί το κύτταρο σε επόμενο στάδιο να εξελιχθεί σε καρκινικό. Ακολουθεί το στάδιο της προαγωγής (promotion) κατά το οποίο μπορεί να συμβαίνουν συνεχόμενες μεταλλάξεις, που προκύπτουν από την έκθεση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα και συνήθως εξελίσσεται πολύ αργά. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ρύθμισης της απόπτωσης και του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Στο στάδιο της προαγωγής μπορεί να συμβεί κλωνική επέκταση των μεταλλαγμένων κυττάρων που έχουν χάσει κάποιες από τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό αφού απαιτεί ένα προαγωγέα, ο οποίος όταν αποσυρθεί σταματά η ανάπτυξη του καρκίνου. Στο στάδιο της προόδου (progression), που ακολουθεί, λαμβάνει χώρα η διάδοση του καρκίνου. Τα κύτταρα αποκτούν τον καρκινικό φαινότυπο, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και έχουν χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης, την ικανότητα να επικοινωνούν με γειτονικά κύτταρα ενώ έχουν την ικανότητα να διηθούνται και να μεθίστανται. Το στάδιο αυτό δεν είναι αντιστρεπτό καθώς πρόκειται για μόνιμο μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά (Εικόνα 11) (Shureiqi et al., 2000; Reddy et al., 2003).



Εικόνα 11: Κύρια στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας.

3.3. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Η πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων έγινε από τον Wattenberg το 1985, με βάση τα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών σε πειραματόζωα (Wattenberg, 1985). Έκτοτε ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει εμπλουτίσει την αρχική ταξινόμησή τους (Kelloff et al., 2004, 2000; Shukla et al., 2004; De Flora et al., 2001).

Όπως προαναφέρθηκε, η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου βασίζεται στην πρώιμη προστασία, πριν την εμφάνισή του (primary prevention) (De Flora & Ferguson, 2005; Smith et al., 2005) και στη μετέπειτα προστασία μετά τη διάγνωση, με σκοπό την αναστροφή και την παρεμπόδιση της περαιτέρω ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention). Έχει προταθεί και η τριτοβάθμια χημειοπροστασία, η οποία αφορά τους ασθενείς μετά τη θεραπεία του καρκίνου (De Flora & Ferguson, 2005; Kelloff et al., 2005). Έχουν προταθεί ποικίλοι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες και κατατάσσονται τόσο στην πρώιμη όσο και στη μετέπειτα προστασία. Γενικότερα, η ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων είθισται να μην αντιμετωπίζεται με απόλυτο τρόπο εξαιτίας των πολλών και πολύπλοκων μηχανισμών που διέπουν την καρκινογένεση. Συνήθως, οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχουν πλειοτροπικές δράσεις δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας με ποικίλους τρόπους είτε μεταξύ τους είτε με τους καρκινογόνους παράγοντες. Ακόμη, οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η βιοδιαθεσιμότητά τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κλπ. (De Flora & Ferguson, 2005; Kelloff et al., 2005). Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε τρείς κύριες κατηγορίες, στους αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου, στους παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης τους καρκινογόνου και στους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005).

3.3.1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασία της καρκινογένεσης (Shukla et al., 2004; De Flora & Ferguson, 2005). Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι παρεμποδιστές σχηματισμού των νιτροζαμίνων από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον (Stoner et al., 1997) καθώς και η τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας (De Flora & Ferguson,

2005). Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι το ασκορβικό οξύ, το φερουλικό, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ, τα σουλφιδριλικά παράγωγα, η προλίνη και η θειοπρολίνη (Stoner et al., 1997).

3.3.2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) δρουν κυρίως στο στάδιο της έναρξης αλλά και στο στάδιο της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας (De Flora & Ferguson, 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, αναστέλλουν τη δράση γενοτοξικών παραγόντων, εξουδετερώνουν ηλεκρονιόφιλους παράγοντες και ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005).

Στους παράγοντες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό κατατάσσονται οι αναστολείς και οι επαγωγείς του κυτοχρώματος P_{450} και οι επαγωγείς των ενζύμων της φάσης ΙΙ (Johnson, 2007; Stoner et al., 1997). Κάποια χημικά προκαρκινογόνα δεν είναι άμεσα καρκινογόνα αλλά πρέπει να μεταβολιστούν για να δώσουν τα τελικά καρκινογόνα (Reddy et al., 2003). Ο μεταβολισμός γενικά διαφόρων ουσιών, ο οποίος είτε πρόκειται να οδηγήσει στην ενεργοποίηση προκαρκινογόνων είτε στην απενεργοποίησή τους γίνεται μέσω των αντιδράσεων της φάσης Ι και ΙΙ. Οι αντιδράσεις της φάσεις Ι αλλάζουν ή απομακρύνουν ενεργές ομάδες από το αρχικό μόριο της ουσίας μέσω οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές είναι το κυτόχρωμα P_{450}. Οι αντιδράσεις της φάσης ΙΙ προσθέτουν άλλες ομάδες στο μόριο μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ, θειικό οξύ κλπ. (Shukla et al., 2004). Ακόμη, στους παράγοντες που διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα κατατάσσονται οι επαγωγείς των ενζύμων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA και οι αναστολείς των τελομερασών ενώ, στους παράγοντες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατατάσσονται εκείνοι που επηρεάζουν την έκφραση και λειτουργία των ογκογονιδίων, και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005).

3.3.3. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Οι παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξής (suppressing agents) δρουν στα στάδια της προαγωγής και της προόδου της καρκινογένεσης (Stoner et al, 1997; De Flora & Ferguson, 2005). Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται οι αναστολείς

του μεταβολισμού των πολυαμίνων, οι επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης, οι ρυθμιστές των σηματοδοτικών μονοπατιών, οι ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, οι αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, οι επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας, οι παράγοντες αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης, οι επαγωγείς της απόπτωσής, οι επιδιορθωτές της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA, οι αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, οι αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και οι αναστολείς της αγγειογένεσης (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005; Johnson, 2007). Ακόμη, σε αυτή την κατηγορία χημειοπροστατευτικών παραγόντων ανήκουν και οι αναστολείς των τοποϊσομερασών, τα οποία είναι ένζυμα σημαντικά για την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Wang et al., 1997). Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να καθυστερήσουν ή να εμποδίσουν τα κύτταρα να αποκτήσουν τον καρκινικό φαινότυπο.

3.4. Φυσικοί και διατροφικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Η χρησιμοποίηση των φυσικών και διατροφικών προϊόντων ως η κυριότερη πηγή φαρμακευτικών στοιχείων είναι καθιερωμένη. Ωστόσο, η φυσική παρουσία των βιοδραστικών ενώσεων ως συστατικών της διατροφής είναι το κύριο χαρακτηριστικό που καθιστά τις διατροφικές φυτοχημικές ενώσεις πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου, βασίζεται κυρίως στα φυσικά και διατροφικά βιοδραστικά στοιχεία. Πολλά τρόφιμα έχουν μελετηθεί για τις προστατευτικές τους ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες χημειοπροστασίας, απέναντι σε διάφορες μορφές καρκίνου (Kelloff et al., 2000; Shukla et al., 2004; Surch, 2003). Μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός διατροφικών βιοδραστικών φυτοχημικών ενώσεων έχει μελετηθεί για τις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητές (Kelloff et al., 2000; Wattenberg, 1992). Ωστόσο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι διατροφικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες προσλαμβάνονται ως μείγματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι διαφορετικοί παράγοντες, που υπάρχουν στα τρόφιμα, να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα και το εύρος των δράσεων των επιμέρους συστατικών. Αυτό, καθιστά απαραίτητη την κατανόηση των επιμέρους ιδιοτήτων των διατροφικών βιοδραστικών στοιχείων ώστε να είναι πιο εύκολη η κατανόηση των ιδιοτήτων τους ως στοιχεία των τροφίμων.

3.5. Πρόγραμμα ανάπτυξης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Μετά την οριοθέτηση της χημειοπροστασίας και των χημειοπροστατευτικών παραγόντων ως σημαντικής προσέγγισης απέναντι στην αντιμετώπιση του καρκίνου (Sporn, 1976; Wattenberg, 1985), ένας μεγάλος αριθμός μελετών εξετάζει μέχρι σήμερα την αναζήτηση νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων καθώς και τους μηχανισμούς με τους οποίους δρουν. Με βάση τις μελέτες, το Διεθνές Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) καθιέρωσε ένα πρόγραμμα ανάπτυξης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Το πρόγραμμα αυτό είχε σκοπό να συντονίσει τη μηχανιστική έρευνα με *in vitro* και *in vivo* δοκιμές σε πειραματόζωα των νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων καθώς και τις περαιτέρω κλινικές και τοξικολογικές μελέτες (Crowell, 2005; Kelloff et al., 2004).

Το 1995 δημιουργήθηκε ένα σχέδιο καθοδήγησης για την ανάπτυξη νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, ή υποψήφιων φαρμάκων (Kelloff et al., 1995). Με βάση το σχέδιο, αρχικά γίνεται ο χαρακτηρισμός της δραστικότητας των υποψήφιων νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων χρησιμοποιώντας *in vitro* μηχανιστικές «χημειοπροστατευτικές» μεθόδους και πειραματικά μοντέλα καρκίνων με πειραματόζωα. Όπως γίνεται με τα εκτιμώνται σε προκλινικές μελέτες και μελέτες φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής (Kelloff et al., 1995).

4. Ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση

4.1. Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο ελεύθερη χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και ενεργά καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστικότητά τους γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται γενικά ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\bullet -}$, και το $OH^{\bullet}$. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet -}$), του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), του αλκοξυλίου ($RO^{\bullet}$) και του υδροπεροξυλίου ($HO_2^{\bullet}$). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου ($CCl_3^{\bullet}$), οι θειούχες ρίζες ($RS^{\bullet}$)και το υποχλωριώδες οξύ (COCl). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου $NO^{\bullet}$ και το διοξείδιο του αζώτου $NO_2^{\bullet}$ καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $ONOO^-$) (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

Παραγωγή και δράση

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στον οργανισμό από ενδογενείς και από εξωγενείς πηγές. Εκτός από επιβλαβείς επιδράσεις στα βιομόρια, η παραγωγή τους αποτελεί και τμήμα φυσιολογικών λειτουργιών. Η κυριότερη ενδογενής πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Ακόμη, παράγονται σε καταστάσεις φλεγμονής από τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα αλλά και από τα υπεροξειδιοσώματα και το σύστημα του κυτοχρώματος P_{450} (Halliwell & Gutteridge 1998; Fang et al., 2002; Valko et al., 2007).

Οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$, είναι μόρια O_2 τα οποία έχουν δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα. Παράγονται από την διαρροή ηλεκτρονίων από τους μεταφορείς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια στο μοριακό οξυγόνο. Παράγονται επίσης από τη δράση πολλών ενζύμων όπως λιποξυγενάση, κυκλοοξυγενάσες, οξειδάση της ξανθίνης, του NADPH, το κυτόχρωμα P_{450} και άλλα ένζυμα. Ως ελεύθερες ρίζες έχουν την ιδιότητα να οδηγούν σε βλάβες αντιδρώντας με διάφορα μόρια μέσα στον οργανισμό. Ωστόσο, οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ παράγονται από τα φαγοκύτταρα με σκοπό την καταστροφή βακτηρίων που έχουν εισέλθει στον οργανισμό. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι μικρές ποσότητες των ριζών αυτών, που εντοπίζονται εξωκυτταρικά, παράγονται ως διακυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλά κύτταρα (Halliwell & Gutteridge, 1998; Valko et al., 2007).

Οι ρίζες $NO^{\bullet}$, οι οποίες παράγονται από το αμινοξύ L-αργινίνη, μπορούν μαζί με τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ να συμβάλουν στον σχηματισμό του περοξυνιτρίτη που είναι ιδιαίτερα επιβλαβές μόριο. Ωστόσο, παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρούνται από τους παράγοντες που ρυθμίζουν την χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων, την αρτηριακή πίεση, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειογένεση. Επιπλέον, είναι από τα πιο διαδεδομένα σηματοδοτικά μόρια, αποτελούν σημαντικούς νευροδιαβιβαστές των νευρικών συνάψεων και παράγονται από τα μακροφάγα για την εξουδετέρωση μικροοργανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1998; Fang et al., 2002).

Το H_2O_2 παράγεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$ μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Το H_2O_2 συμμετέχει στην αντίδραση Fenton (Εικόνα 12 (2)) μέσω της οποίας οδηγεί στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών $OH^{\bullet}$. Ωστόσο, μπορεί να έχει ευεργετικές δράσεις καθώς χρησιμοποιείται από το ένζυμο θυρεοειδική δισμουτάση για την σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών και μερικές φορές δρα σαν διακυτταρικό σηματοδοτικό μόριο.

Στις εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται η έκθεση σε μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. καπνός τσιγάρου, περιβαλλοντικοί ρύποι, τα εντομοκτόνα κλπ.), η έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια), η ιονίζουσα και υπεριώδης ακτινοβολία καθώς και συντηρητικά τροφών και πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Halliwell & Gutteridge 1998; Kohen & Nyska, 2002).

Επιβλαβείς δράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και τις μετουσιώνουν, προκαλούν βλάβες στο DNA οδηγώντας στην δημιουργία μεταλλάξεων και οξειδώνουν τα λιπίδια των μεμβρανών. Ακόμη, σχετίζονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος, η αρτηριοσκλήρυνση και κάποιες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) καθώς και με τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

Χαρακτηριστική είναι η δράση της ρίζας του υδροξυλίου $OH^{\bullet}$, που θεωρείται μια από τις πιο επιβλαβείς ρίζες, η οποία αντιδρά με οτιδήποτε βρίσκεται κοντά στην περιοχή που παράγεται. Παράγεται συνήθως όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία διασπά τους δεσμούς O-H στο νερό, που είναι το πιο άφθονο συστατικό των κυττάρων, οδηγώντας στην παραγωγή των ριζών $OH^{\bullet}$ και $H^{\bullet}$. Οι ρίζες $OH^{\bullet}$ προσβάλλουν τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Από τα πιο σημαντικές ιδιότητες των ριζών αυτών είναι οι τροποποιήσεις που προκαλούν στις βάσεις του DNA (Halliwell & Gutteridge 1998; Marnett, 2000).

Οι ρίζες $OH^{\bullet}$ παράγονται επίσης από τις ρίζες $O_2^{\bullet -}$ και H_2O_2 μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (Εικόνα 12) και της αντίδρασης Fenton (Εικόνα 12(2)) αντίστοιχα παρουσία μετάλλων ιόντων σιδήρου (Fe) ή χαλκού (Cu) (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell 2001).

$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ (1)

$H_2O_2 + Fe^{2+}$ (ή Cu^{+}) $\rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$ (ή Cu^{2+}) (2)

$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-}$ (Παρουσία Fe^{3+} ή Cu^{2+}) (3)

Εικόνα 12: Αντιδράσεις Fenton (2), Haber-Weiss (1-3).

Επιδράσεις στο DNA

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να προσβάλουν το DNA προκαλώντας μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα, τροποποίηση των βάσεων και χιάσματα στο DNA. Περισσότερες από 100 οξειδωτικές τροποποιήσεις έχουν αναγνωριστεί στο DNA μέχρι σήμερα (Klaunig & Kamendulis, 2004; Dizdarglu et al., 2002; Cox et al., 2001). Η πιο γνωστή και μελετημένη οξειδωτική τροποποίηση στις βάσεις του DNA, είναι η 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (OH8dG), η οποία προκύπτει από την οξείδωση της γουανίνης στη θέση του C8 του πουρινικού δακτυλίου. Αυτή η οξειδωτικά τροποποιημένη βάση οδηγεί στο σχηματισμό μεταλλάξεων και συγκεκριμένα G → T μετατροπές οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε μεταλλαγμένα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η τροποποίηση της OH8dG δημιουργείται κυρίως από τη δράση των ιδιαίτερα δραστικών ριζών $OH^{\bullet}$. Οι ρίζες αυτές μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό διαφόρων οξειδωμένων προϊόντων, καθώς μπορούν να αντιδράσουν με τη δεοξυριβόζη αλλά και με τις αζωτούχες βάσεις του DNA (Marnett, 2000; Cadet et al., 1999; Dizdarglu et al., 2002).

Επιδράσεις στις πρωτεΐνες

Στις πρωτεΐνες ορισμένα αμινοξέα είναι πολύ ευπαθή στη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι ROS αντιδρούν με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα την ιστιδίνη, την αργινίνη, τη λυσίνη και την προλίνη και παράγουν προϊόντα με καρβονυλομάδες. Ακόμη, οι –SH ομάδες της κυστεΐνης οξειδώνονται σε θειολικές ρίζες ($RS^{\bullet}$) μετά από την επίδραση ROS και με άμεση αντίδραση με ιόντα μεταβατικών μετάλλων (Valko et al., 2007). Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργικότητας και της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών. Οι πολύ δραστικές ρίζες $OH^{\bullet}$ μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία θραυσμάτων στους δεσμούς που συνδέουν τα αμινοξέα μεταξύ τους, οδηγώντας στον κατακερματισμό της πρωτεϊνικής αλυσίδας (Klaunig & Kamendulis, 2004).

Επιδράσεις στα λιπίδια

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι πολύ ευπαθή στη δράση των ελευθέρων ριζών. Μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με τα λιπαρά οξέα των μεμβρανικών λιπιδίων και να ξεκινήσει μια αλυσιδωτή σειρά αντιδράσεων, που μπορεί να οδηγήσει σε λιπιδική υπεροξείδωση (Εικόνα 13) (Halliwell, 2001; Mylonas & Kouretas, 1999). Η λιπιδική υπεροξείδωση οδηγεί σε αστάθεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, η οποία

στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Κατά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξείδωσης παράγονται νέες ρίζες οι οποίες μπορούν να ξεκινήσουν από την αρχή τις αντιδράσεις και μόρια τα οποία είναι τοξικά για τα κύτταρα (Mylonas & Kouretas, 1999). Κύρια τοξικά παράγωγα της λιπιδικής υπεροξείδωσης είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA), εποξείδια και αλδεΰδες, όπως η 4-υδροξυνονενάλη. Και η MDA και η 4-υδροξυνονενάλη είναι μόρια, τα οποία προσβάλουν το DNA προκαλώντας ποικίλες τροποποιήσεις και σπασίματα (Klaunig & Kamendulis, 2004; Marnett, 2002).

$$LH + R^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + H_2O$$

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow L\text{-}O\text{-}O^{\bullet}$$

$$L\text{-}O\text{-}O^{\bullet} + LH \rightarrow L\text{-}O\text{-}OH + L^{\bullet}$$

$$L\text{-}O\text{-}OH \rightarrow L\text{-}O\text{-}O^{\bullet}, LO^{\bullet}, RCHO$$

Εικόνα 13: Αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Μία ελεύθερη ρίζα ($R^{\bullet}$) μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH) και στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών. Οι αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό μιας ρίζας με κεντρικό μόριο τον άνθρακα ($L^{\bullet}$ ή $-C^{\bullet}$) η οποία στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο O_2 οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ρίζας περοξυλίου ($LOO^{\bullet}$ ή γενικά $ROO^{\bullet}$), η οποία με την σειρά της μπορεί να αντιδράσει με έναν νέο υδρογονάνθρακα οδηγώντας στον σχηματισμό νέας ρίζας η οποία μπορεί να ξαναξεκινήσει τον κύκλο των αντιδράσεων.

4.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας για την αντιμετώπιση των επιβλαβών δράσεων των ελευθέρων ριζών. Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος. Το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας απαρτίζεται από ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες είτε μειώνουν την παραγωγή τους (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell 2001).

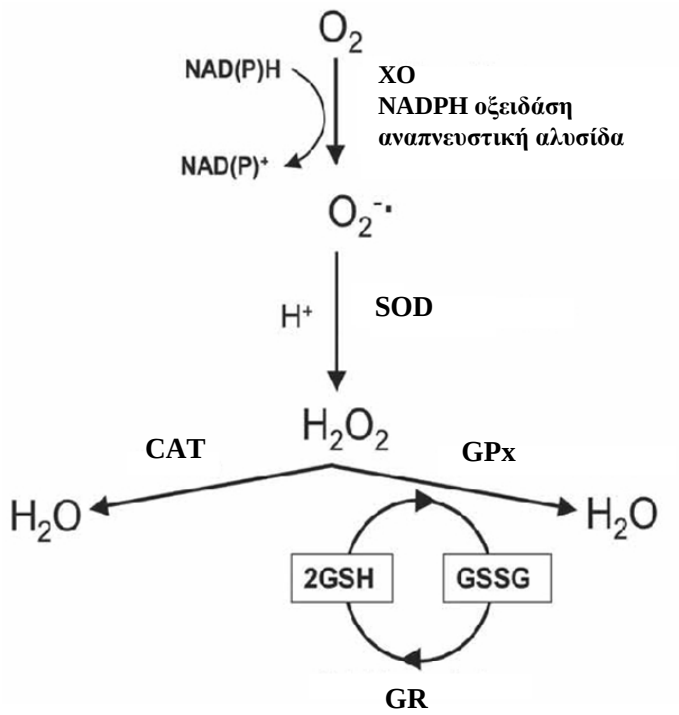
4.2.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ανήκουν διάφορα ένζυμα τα οποία είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες είτε μειώνουν την παραγωγή τους. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) (Πίνακας 3, Εικόνα 14) (Halliwell & Gutteridge 1998). Παρά τις πολλές μελέτες για τη δράση και τις ιδιότητες αυτών των ενζύμων, καθώς και για τη συμμετοχή τους στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων απέναντι στις ROS, δεν είναι ξεκάθαρη η σημασία τους στα κύτταρα καθώς και οι συνεργικές δράσεις μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται στην ετερογένεια των πειραματικών μεθόδων που εκτιμούν τη δράση τους, καθώς και στις διαφορετικές οξειδωτικές συνθήκες του κάθε πειράματος, οι οποίες προσδιορίζονται από τον τύπο του συστήματος παραγωγής των ελευθέρων ριζών, την περιοχή στην οποία παράγονται οι ρίζες (ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά), το χρόνο έκθεσης στις ρίζες κλπ.. Επίσης, η ερμηνεία της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζύμων ποικίλει ανάλογα με την κυτταρική απόκριση που επιλέγεται για τον προσδιορισμό της προστατευτικής δράσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προστατευτική δράση της GPx και της SOD είναι προσθετική ενώ η δράση της SOD και της CAT είναι συνεργική (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 1998).

Πίνακας 3: Αντιδράσεις που καταλύουν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα

Ένζυμα	**Αντίδραση που καταλύουν**
Υπεροξειδική δισμουτάση	$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Καταλάση	$2\ H_2O_2 \Leftrightarrow O_2 + H_2O$
Περοξειδάση της γλουταθειόνης	$GSH + R^{\bullet} \rightarrow GSSG + R$
Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	$NADPH + GSSG \Leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

GSH: γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης, $R^{\bullet}$: ελεύθερη ρίζα, NADPH: φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων των κύριων ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας. XO: οξειδάση της ξανθίνης, SOD: υπεροξειδική δισμουτάση, CAT: καταλάση, GPx: περοξειδάση της γλουταθειόνης, GR: αναγωγάση της γλουταθειόνης.

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η δράση της SOD ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τους McCord και Fridovichin (McCord & Fridovichin, 1969). Η SOD καταλύει την αντίδραση αυτοοξείδωσης του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 και O_2 (Πίνακας 3). Υπάρχει σε τρεις μορφές με την ίδια καταλυτική δράση, την κυτταροπλασματική μορφή (Cu/ZnSOD) τη μιτοχονδριακή (MnSOD), και μία νέα μορφή (Cu/ZnSOD) που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και εντοπίζεται εξωκυτταρικά και διαφέρει από την κυτταροπλασματική (Halliwell & Gutteridge, 1998; Michiels et al., 1994).

Η κυτταροπλασματική μορφή της SOD (Cu/ZnSOD), είναι ένα ομοδιμερές 32 kD, και αποτελεί περίπου το 70% των μορφών της SOD. Είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων (Crapo et al, 1992). Η μιτοχονδριακή Mn-SOD είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες μεταξύ τους υπομονάδες 96 kD, που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα (Whittaker, 2000). Η εξωκυττάρια-SOD (Cu/ZnSOD) είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ στον εξωκυττάριο χώρο. Πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kD, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και το

0,5-17% των μορφών της SOD. Ο ρόλος της συγκεκριμένης μορφής SOD είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής της στους ιστούς (Oury et al., 1996).

Η SOD θεωρείται ότι είναι από τα ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiels et al., 1994). Κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet -}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon 2000).

Καταλάση (CAT)

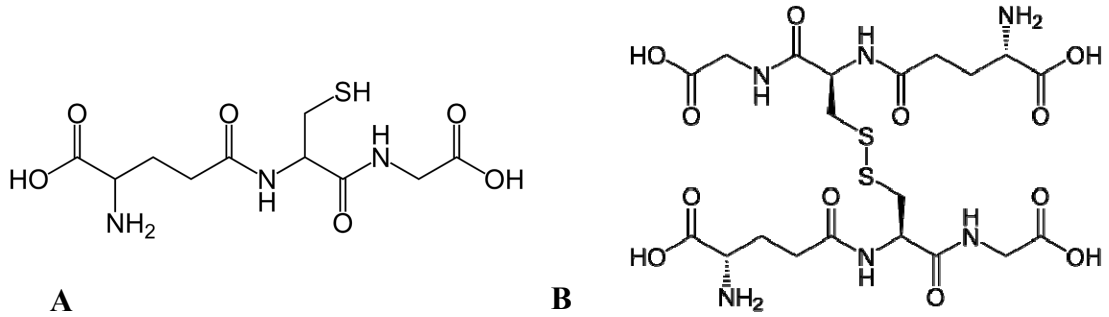
Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 (Πίνακας 3). Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Chance et al., 1986; Masters et al., 1986). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Περοξειδάση (GPx) και αναγωγάση (GR) της γλουταθειόνης

Η περοξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια σεληνοπρωτεΐνη (Se-GPx). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες υπομονάδες 22 kD (Spallholz & Boylan, 1991). Κάθε μία περιέχει ένα άτομο σεληνίου, καθώς μια σεληνοκυστεΐνη είναι αυτή που εμπλέκεται στην καταλυτική δράση της GPx. Η GPx είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια και συμμετέχει στην αναγωγή λιπιδικών και μη υδροπεροξειδίων. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH) (Πίνακας 3). Η δράση της GPx είναι εξειδικευμένη για τον δέκτη του υδρογόνου, την GSH, αλλά δεν είναι εξειδικευμένη για το υπόστρωμα, δίνοντας τη δυνατότητα να μπορεί να αλληλεπιδράσει με διαφορετικές ελεύθερες ρίζες (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge 1998). Από κινητικής πλευράς η GPx και η CAT συμμετέχουν και οι δύο στην απομάκρυνση του H_2O_2. Ωστόσο η GPx έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το H_2O_2 από την CAT, κατά συνέπεια το H_2O_2 αποικοδομείται κυρίως από την GPx σε φυσιολογικές συνθήκες (Jones et al., 1981; Antunes et al., 2002).

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη, ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly), και υπάρχει στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) στα κύτταρα (Εικόνα 15) (Meister & Anderson, 1983). Η GSSG μετά το σχηματισμό της από την GPx ανάγεται σε GSH μέσω της δράσης του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Η GR είναι ένα διμερές ένζυμο το οποίο φέρει δύο μόρια FAD στα ενεργά του κέντρα, τα οποία χρησιμοποιούν το NADPH για την αναγωγή της GSSG (Πίνακας 3). Το NADPH με τη σειρά του, ανανεώνεται από τη δράση του ενζύμου δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge 1998).

Στα κύτταρα η συγκέντρωση της GSH είναι 10 ή 100 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της GSSG. Αύξηση της ενδοκυτταρικής GSSG οφείλεται στην αποικοδόμηση του H_2O_2 από την GPx. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, ακόμη και μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al., 1988).



Εικόνα 15: Χημικές δομές των δύο μορφών της γλουταθειόνης. (A) GSH, (B) GSSG.

4.2.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

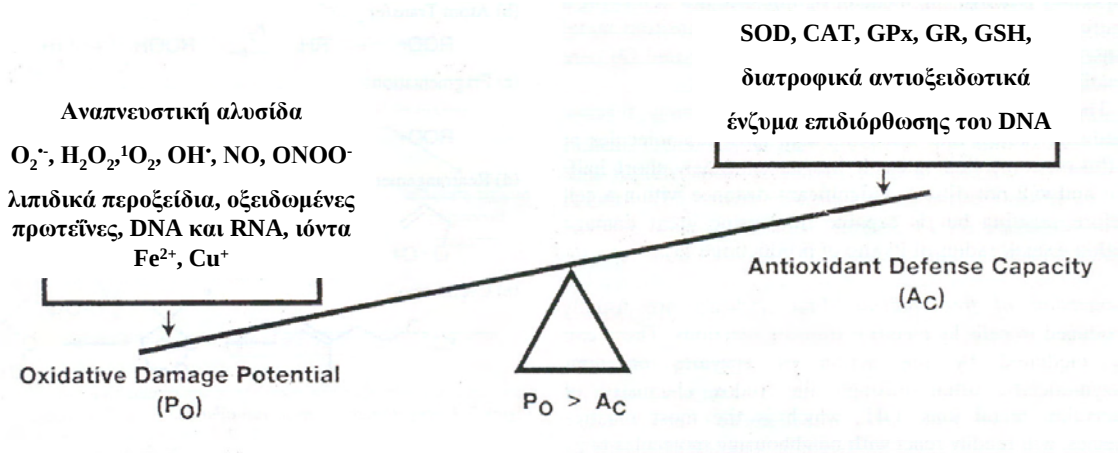
Βασικές προϋποθέσεις για τον χαρακτηρισμό ενός μορίου ως αντιοξειδωτικού είναι να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση ενός προς οξείδωση υποστρώματος και οι ρίζες που προκύπτουν μετά τη δράση του να είναι σταθερές. Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται διάφορα διατροφικά συστατικά όπως η βιταμίνη Ε, το β-καροτένιο, το ασκορβικό οξύ καθώς και η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q_{10}. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται και οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις (Halliwell & Gutteridge 1998).

4.3. Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες εκτός από τις επιβλαβείς επιδράσεις τους, συμμετέχουν και σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Έτσι στον οργανισμό οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε μία ισορροπία. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, κατά την οποία υπερισχύει η πρώτη, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (Εικόνα 16) (Halliwell & Gutteridge, 1998; Sies, 1985). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS/RNS). Αυτό συμβαίνει είτε από έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε σε παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Κατά το οξειδωτικό στρες, η υπεροχή των οξειδωτικών παραγόντων συνήθως οδηγεί σε πρόκληση βλαβών στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ROS και του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων και από το ενδοκυτταρικό φορτίο των ελευθέρων ριζών. Έρευνες έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1998).



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του οξειδωτικού στρες. Η ισορροπία των αντιοξειδωτικών και των ελευθέρων ριζών διαταράσσεται υπέρ των ελευθέρων ριζών.

Δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες

Διάφορες μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (Armstrong, 2002; Jackson, 1999; Wood et al., 2006) και οι πιο συνηθισμένοι δείκτες, είναι προϊόντα της οξείδωσης του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (Hwang & Kim, 2007; Jackson, 1999; Halliwell & Whiteman, 2004).

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικής προσβολής του DNA από ελεύθερες ρίζες (Halliwell & Whiteman, 2004; Dizdarglu et al., 2002). Ο πιο συνηθισμένος δείκτης είναι η συγκέντρωση της OH8dG (Halliwell & Whiteman, 2004; Collins, 2005; Dizdarglu et al., 2002), καθώς και άλλα οξειδωμένα προϊόντα του DNA (Halliwell & Whiteman, 2004; Dizdarglu et al., 2002). Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, ο κυριότερος δείκτης οξείδωσής τους είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αμινοξέα όταν οξειδώνονται δημιουργούν προϊόντα με καρβονυλομάδες, οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν μετά από αντίδραση με τη 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνη (DNPH) (Therond et al., 2000; Levine et al., 1990). Εκτός από τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και άλλες οξειδωτικές τροποποιήσεις των αμινοξέων χρησιμοποιούνται ως δείκτες εκτίμησης της οξείδωσης των πρωτεϊνών (Hawkins et al., 2009). Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης που χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτες για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες είναι τα συζευγμένα διένια, τα λιπιδικά υδροπεροξείδια, η μαλονυαλδεΰδη (MDA), τα ισοπροστάνια, η 4-υδροξυνονενάλη και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Therond et al., 2000; Halliwell & Whiteman, 2004)

Ακόμη, η δραστικότητα και τα επίπεδα έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς και οι μεταβολές στο σύστημα της γλουταθειόνης αποτελούν δείκτες του οξειδωτικού στρες (Therond et al., 2000). Ο λόγος GSH/GSSG θεωρείται πολύ σημαντικός δείκτης εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Όπως προαναφέρθηκε ακόμη και μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG. Επειδή ο λόγος της συγκέντρωσης της GSH και της GSSG στα κύτταρα βρίσκεται σε ισορροπία, μια διαταραχή οφείλεται είτε σε μείωση της συγκέντρωσης της GSH είτε σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al., 1988). Ωστόσο η ισορροπία του οξειδοαναγωγικού συστήματος της γλουταθειόνης μπορεί να διατηρηθεί ακόμη και σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες με την αύξηση της δράσης της GR (Schafer & Buettner, 2001).

Με την εξέλιξη της έρευνας οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται γίνονται όλο και πιο ακριβείς και εξειδικευμένοι για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες και των δεικτών εκτίμησής του τόσο *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo*. Για την αρτιότερη εκτίμηση του

οξειδωτικού στρες είναι σημαντικός ο προσδιορισμός διαφορετικών δεικτών ανάλογα με το εξεταζόμενο σύστημα.

Δείκτες εκτίμησης της αντιοξειδωτική ικανότητας

Εκτός από τους δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες τα τελευταία χρόνια μια πληθώρα μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διάφορων μορίων (Sanchez-Moreno, 2002; Kaur & Geetha, 2006; Prior et al., 2005). Οι κυριότερες και πιο διαδεδομένες μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) (Cao et al., 1993), TRAP (Total traping antioxidant parameter) (Bartosz et al., 1998) η FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (Pulido et al., 2000), η CUPRAC (Copper reduction assay) (Apak et al., 2004) καθώς και εκείνες που χρησιμοποιούν τις ρίζες DPPH (Brad-Williams et al., 1995) και ABTS (Miller et al., 1993). Κάθε αντιοξειδωτική ουσία έχει πλειοτροπική δράση η οποία θα πρέπει να εκτιμάται με διαφορετικές μεθόδους και σε διαφορετικά συστήματα. Η συνδυαστική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συμβάλει στην πιο άρτια εκτίμηση των ιδιοτήτων των αντιοξειδωτικών ουσιών καθώς και των διαφορετικών τους μηχανισμών (Aruoma, 2003; Sanchez-Moreno, 2002; Kaur & Geetha, 2006).

4.4. Ελεύθερες ρίζες και καρκινογένεση

Οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με διάφορους μηχανισμούς με την καρκινογενετική διαδικασία (Klaunig & Kamendulis, 2004). Όπως προαναφέρθηκε βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων (Shureiqi et al., 2000; Reddy et al., 2003). Πολλοί καρκινογόνοι και μεταλλαξιγόνοι παράγοντες έχουν την ικανότητα να οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να προκαλούν τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA και στα χρωμοσώματα (Hussain et al., 2003; Valko et al., 2004; Guyton & Kensler, 1993). Ακόμη μέσω των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξείδωσης μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις και σπασίματα στις αλυσίδες του DNA (Klaunig & Kamendulis, 2004; Marnett, 2002). Στην περίπτωση που οι επαγόμενες βλάβες στο DNA δεν επιδιορθωθούν, μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή ή επαγωγή της μεταγραφής, σε επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών, σε βλάβες κατά την αντιγραφή και γενωμική αστάθεια, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την έναρξη της καρκινογένεσης. Παρότι οι μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA σχετίζονται κυρίως με την καρκινογένεση, και το μιτοχονδριακό DNA είναι ευπαθές σε μεταλλάξεις από τη δράση

των ελευθέρων ριζών. Οι μεταλλάξεις και η τροποποίηση της λειτουργικότητας του μιτοχονδιακού γενώματος είναι ένας ακόμη μηχανισμός της καρκινογενετικής δράσης των ελευθέρων ριζών (Cavalli & Liang, 1998; Klaunig & Kamendulis, 2004).

Μεγάλη σημασία για την καρκινογενετική διαδικασία έχει η απορύθμιση ή η αυξημένη παραγωγή ενδοκυτταρικών παραγόντων που οδηγούν σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης. Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο οι οξειδωτικές τροποποιήσεις στο DNA μπορεί να συμβάλλουν στην καρκινογένεση είναι μέσω απορρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Hussain et al., 2003; Klaunig & Kamendulis, 2004). Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν και σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Έχει προταθεί ότι οι ROS ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κατά το στάδιο της προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας (Slater et al., 1995; Burdon, 1995; Cerutti, 1985). Η ιδιότητα αυτή είναι αρκετά περίπλοκη και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της απόπτωσης ή νέκρωσης των κυττάρων ενώ η χαμηλή συγκέντρωσή τους επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια, τη γονιδιακή έκφραση όπως την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Klaunig & Kamendulis, 2004; Das, 2002). Ωστόσο, η επαγωγή της απόπτωσης με τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών, αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό απέναντι στην καρκινογενετική διαδικασία (Das, 2002; Hail et al., 2008). Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα οδηγούν στην απόπτωση και στον κατακερματισμό του DNA μέσω ελευθέρων ριζών (Hadi et al., 2007; Hail et al., 2008).

5. Βιολογικές-χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων

5.1. Γενικά

Περισσότερες από 250 επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών δρουν προστατευτικά στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλων χρόνιων ασθενειών (Surch, 2003; Scalbert et al., 2005; Arts & Hollman, 2005). Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στις περιεχόμενες σε αυτά βιοδραστικές ενώσεις. Καθώς οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων οι βιολογικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Fresco et al., 2006; Yang et al., 2001; Nichenamentla et al., 2006).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Crozier et al., 2009; Lambert et al., 2005). Θεωρούνται πολύ σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς σε όλα τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (Fresco et al., 2006; Manson et al., 2000; Le Marchand, 2002). Ωστόσο, ένα από τα δυσκολότερα προβλήματα για την εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων των πολυφαινολικών ενώσεων είναι ο μεγάλος αριθμός τους που υπάρχει στα τρόφιμα και οι διαφορετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν από ποικίλες *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Lambert et al., 2005; Ren et al., 2003).

5.2. Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων

Η διαθεσιμότητα των τροφών σε πολυφαινολικές ενώσεις και η χαρακτηριστική τους χημική δομή, τις καθιστά αντιοξειδωτικά (Rice-Evans et al., 1996). Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν με διάφορους τρόπους σε όλα τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας. Το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν κύριους παράγοντες, που προσβάλουν το DNA προκαλώντας σ’ αυτό επιβλαβείς τροποποιήσεις, εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στον κλωνικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλουν στην απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Klaunig & Kamendulis, 2004; Hail et al., 2008). Έτσι, η χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων, έχει αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Shukla & Kumar Pal, 2004).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν αντιοξειδωτικά με ποικίλους μηχανισμούς οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτενέστερα τόσο με *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες. Έχουν

την ικανότητα να αλληλεπιδρούν άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες και να δεσμεύουν χηλικά ιόντα μετάλλων που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Ακόμη, επηρεάζουν τη δραστικότητα οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων και έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνουν την οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (Williamson & Manach, 2005; Dragsted, 2003). Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

Άμεση αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες

Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν σημαντικές αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαιτίας της ιδιότητάς τους να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Οι πολυφαινόλες μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους. Δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (Αντίδραση 1) (Blokhina et al., 2003; Ferguson, 2001).

$$RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet} \text{ (Αντίδραση 1)}$$

$RO^{\bullet}$: ελέυθερη ρίζα

PPH: πολυφαινόλική ένωση

$PP^{\bullet}$: φαινολική ρίζα

Χαρακτηριστική είναι η δράση των φλαβονοειδών τα οποία δεσμεύουν διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρώντας άμεσα με τη ρίζα. Λόγω της μεγάλης δραστικότητας των υδροξυλικών ομάδων των φλαβονοειδών οι ελεύθερες ρίζες αδρανοποιούνται και οι ρίζες των φλαβονοειδών που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες (Αντίδραση 2) (Nijveldt et al., 2001).

$$\text{Φλαβονοειδές (OH)} + R^{\bullet} \rightarrow \text{Φλαβονοειδές } (O^{\bullet}) + RH \text{ (Αντίδραση 2)}$$

Η φύση των φαινολικών ριζών που παράγονται μετά την δέσμευση μιας ελεύθερης ρίζας αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Οι περισσότερες φαινολικές ρίζες είναι σταθερές και έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό και να οδηγήσει σε μία νέα σειρά αντιδράσεων. Η ρίζα αυτή μπορεί ακόμη να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της, οδηγώντας στην δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson, 2001). Ένας μεγάλος αριθμός εργασιών έχει μελετήσει την ικανότητα αλληλεπίδρασης των πολυφαινολικών ενώσεων με διάφορες ελεύθερες ρίζες (Burda & Olszek, 2001; Seifreid et al., 2007; Rice-Evans et al., 1997).

Μελέτες έχουν συσχετίσει δομικά στοιχεία στην χημική δομή των πολυφαινολικών ενώσεων με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Rice-Evans et al., 1996; Heim et al., 2002; Bors & Michel, 2002). Στα φλαβονοειδή η θέση και ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων, η παρουσία διπλών δεσμών στον δακτύλιο C, της γενικής δομής των φλαβονοειδών (Εικόνα 4), και οι υποκαταστάσεις των υδροξυλικών ομάδων με σάκχαρα, μεθυλομάδες ή άλλους υποκαταστάτες επηρεάζουν την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996; Heim et al., 2002; Cotelle, 2001). Έχει βρεθεί ότι στην χημική τους δομή υπάρχουν τρία κριτήρια τα οποία όταν πληρούνται εξασφαλίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα:

Η υδροξυλίωση στον Β δακτύλιο

Οι υδροξυλομάδες και η διαμόρφωσή τους στο χώρο, στο Β δακτύλιο του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996; Heim et al. 2002; Bors & Michel, 2002). Η ύπαρξη της ορθο-διφαινυλικής τοποθέτησης των 3΄ και 4΄ υδροξυλομάδων στον Β δακτύλιο, του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών είναι η πιο αποτελεσματική (Εικόνα 4). Η τοποθέτηση αυτή παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα στην φαινολική ρίζα μετά από την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και συμμετέχει στην μετατόπιση του ηλεκτρονίου ώστε να μην είναι διαθέσιμο για επόμενη αντίδραση (Rice-Evans et al., 1996).

Η ύπαρξη διπλού δεσμού στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου C του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών

Η ύπαρξη διπλού δεσμού ανάμεσα στους άνθρακες 2 και 3 του δακτυλίου C έχει μεγάλη σημασία στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο διπλός δεσμός σε συνδυασμό με την 4 οξο-ομάδα, συμβάλει στην μετατόπιση του ηλεκτρονίου από τον δακτύλιο Β. Επειδή η αντιοξειδωτική ισχύς σχετίζεται με την θέση που βρίσκεται το ηλεκτρόνιο στον αρωματικό πυρήνα, όταν οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες οι φαινολικές ρίζες που παράγονται σταθεροποιούνται, μέσω του φαινομένου του συντονισμού του αρωματικού πυρήνα (Rice-Evans et al., 1996; Bors & Michel, 2002).

Η θέση των υδροξυλομάδων

Η 3-OH ομάδα του δακτυλίου Α και η 5-OH ομάδα μαζί με την οξο-θέση του δακτυλίου C είναι απαραίτητες για την μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών.

Εκτός από τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά που παρέχουν την μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα στα φλαβονοειδή γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των πολυφαινολικών ενώσεων είναι:

Η γλυκοσυλίωση των υδροξυλομάδων

Η παρουσία του σακχάρου ενώ αυξάνει την διαλυτότητα και την βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολικών ενώσεων (Scalbert & Williamson, 2000), παράλληλα μειώνει την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Ferguson, 2001; Rice-Evans et al., 1996). Εκτός όμως από την παρουσία του σακχάρου παίζει ρόλο και η θέση και η δομή του. Αυτό συμβαίνει γιατί εκτός από το ότι καταλαμβάνει τις ελεύθερες υδροξυλομάδες η θέση του και η δομή του μπορεί να επηρεάζουν με διάφορους τρόπους την επίπεδη διαμόρφωση των φλαβονοειδών στον χώρο, που είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική τους δράση (Heim et al., 2002).

Ο πολυμερισμός των φλαβονοειδών

Ο πολυμερισμός αυξάνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Οι διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες είναι πιο αποτελεσματικές από μονομερή φλαβονοειδή στη δέσμευση ριζών σουπεροξειδίου και όσο αυξάνεται ο πολυμερισμός τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύουν διάφορες ελεύθερες ρίζες (Heim et al., 2002).

Ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων

Γενικά όσο αυξάνεται ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων τόσο αυξάνεται η ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων τους εξαρτάται από τον αριθμό και την θέση των υδροξυλικών ομάδων τους. Συγκεκριμένα η παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη μετα-θέση του βενζοϊκού δακτυλίου των υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ίδιο συμβαίνει και στα υδροξυκινναμικά οξέα στα οποία όσο μεγαλώνει ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996).

Η επίπεδη διαμόρφωση των δακτυλίων των φλαβονοειδών

Η ροπή στρέψης του Β δακτυλίου σε συνδυασμό με την δομή του υπόλοιπου μορίου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Πιστεύεται ότι οι υδροξυλομάδες του Β δακτυλίου δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με την 3-OH ευθυγραμμίζοντας των Β δακτύλιο με τον Α δακτύλιο. Η επίπεδη διαμόρφωση στον χώρο επιτρέπει την μετατόπιση του ηλεκτρονίου η οποία συμβάλλει στην σταθερότητα τις ρίζας του φλαβονοειδούς που σχηματίζεται μετά την δέσμευση της ελεύθερης ρίζας. Οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες οι οποίες φέρουν μία 3-OH ομάδα είναι επίπεδες, ενώ οι φλαβόνες και οι φλαβανόνες στις οποίες δεν υπάρχει αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι τόσο επίπεδες. Η απομάκρυνση της 3-OH επηρεάζει την επίπεδη διαμόρφωση και έτσι μετριάζει την ικανότητα δέσμευσης. Επιπλέον αυτό συμβαίνει και με την υποκατάσταση της 3-OH με μεθυλομάδα ή σάκχαρο (Heim et al., 2002).

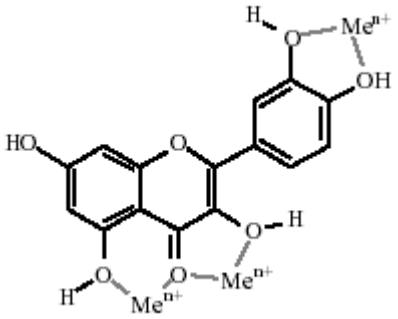
Η υποκατάσταση των υδροξυλομάδων από μεθυλομάδες

Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα στα πολυυδροξυλιωμένα φλαβονοειδή και τα πολυμεθοξυλιωμένα οφείλονται στις διαφορές στην υδροφοβικότητα και στην επίδραση στην επίπεδη διαμόρφωση που είναι σημαντική για την σταθερότητα της ρίζας του φλαβονοειδούς. Ωστόσο η αναλογία των μεθυλικών υποκαταστατών δεν μπορεί να προβλέψει την επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα, συνήθως όμως οδηγεί στην μείωσή της (Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1996).

Χηλική δέσμευση ιόντων μεταβατικών μετάλλων

Τα ιόντα χαλκού και σιδήρου μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton (Εικόνα 17) συμβάλλουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών (Halliwell & Gutteridge 1998). Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα μεταβατικών μέταλλων (Cu^{+} και Fe^{2+}) (Nijveldt et al., 2001; Mira et al., 2002; Perron & Brumaghim, 2009) καθώς και να εμποδίζουν την αναγωγή των ιόντων Fe^{3+} ή Cu^{2+} (Yoshino & Murakami, 1998). Τα ιόντα σιδήρου έχουν την ικανότητα να αυτοοξειδώνονται από Fe^{2+} σε Fe^{3+}. Οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την συμμετοχή των ιόντων Fe^{2+} στην παραγωγή ριζών αυξάνοντας την αυτοοξείδωση των ιόντων Fe^{2+} (Yoshino & Murakami, 1998; Perron & Brumaghim, 2009).

Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για την ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά τα ιόντα του χαλκού και του σιδήρου (Heim et al., 2002; Psotova et al., 2003). Στα φλαβονοειδή η υδροξυλίωση στους C3΄ και C4΄ του Β δακτυλίου του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών, και η 4 οξο-ομάδα στον δακτύλιο C μαζί την υδροξυλομάδας στον C5 συμβάλουν στην αλληλεπίδραση με τα ιόντα των μετάλλων. Πιστεύεται ότι τα χηλικά σύμπλοκα με τα δισθενή κατιόντα, όπως Fe^{2+}, μπορεί να συμβαίνουν ανάμεσα στην 5-OH και την 4-οξο ομάδα του δακτυλίου C ή ανάμεσα στην 3΄ και 4΄ υδροξυλομάδας του Β δακτυλίου, καθώς και ανάμεσα στην 3-OH και την 4-οξο ομάδα του δακτυλίου C (Εικόνα 4) (Heim et al., 2002; Cotelle, 2001). Επιπλέον η γλυκοσυλίωση δεν φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν μέταλλα (Heim et al., 2002). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που καθιστά τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια είναι ότι η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Έτσι προστατεύουν διπλά, δεσμεύοντας τις ρίζες και εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους (Heim et al., 2002).



Εικόνα 17: Σημεία χηλικής δέσμευσης των ιόντων μεταβατικών μετάλλων στο βασικό ανθρακικό σκελετό των φλαβονοειδών.

Αλληλεπίδραση με ένζυμα

Αναστολή της δράσης ενζύμων που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών

Οι πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν ένζυμα τα οποία μέσω της καταλυτικής τους δράσης οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Ferguson 2001, Rice-Evans et al., 1996). Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν ανασταλτική δράση απέναντι στα ένζυμα κυκλοοξυγενάση, λιποοξυγενάση (Laughton et al., 1991) και NADPH οξειδάση (Hodnick et al., 1994).

Ακόμη, οι πολυφαινολικές ενώσεις αναστέλλουν την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) (Cos et al., 1998; Nagao et al., 1999). Η XO χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του

υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) (Olson et al., 1974; McCord & Fridovich, 1968). Αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου αναστέλλεται και η παραγωγή αυτών των ριζών. Η ΧΟ είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί ως υποστρώματα την υποξανθίνη και την ξανθίνη τις οποίες οξειδώνει προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος (Εικόνα 18). Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια των υδροξυλασών μολυβδαινίου και αποτελείται από δύο υπομονάδες 145 kD. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από αμινοτελικό άκρο (20 kD) που περιέχει δύο κέντρα σιδήρου-θείου (Fe_2S_2) και ένα δινουκλεοτίδιο φλαβινοαδενίνης (FAD) (40 kD) και ένα καρβοξυτελικο άκρο το οποίο περιέχει μια μολυβοπτερίνη (85 kD) με τέσσερα οξειδωαναγωγικά κέντρα. Η ενεργή της μορφή είναι ένα ομοδιμερές 290 kD και κάθε μονομερές δρα ανεξάρτητα κατά τις καταλυτικές αντιδράσεις (Borges et al., 2002; Hille, 2006).

Η μελέτη της σχέσης δομής-δράσης των φλαβονοειδών ως αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C5 και C7 και ο διπλός δεσμός ανάμεσα στον C2 και C3 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 4) ευνοούν την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών. Ωστόσο, η παρουσία μιας υδροξυλικής ομάδας στον C-3 και η γλυκοσυλίωση των υδροξυλομάδων μειώνουν την ανασταλτική τους δράση απέναντι στην ΧΟ (Cotelle, 2001; Nagao, et al., 1999).

Εικόνα 18: Αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης.

Επαγωγή της έκφρασης και δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων

Εκτός από τις προηγούμενες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ορισμένες πολυφαινόλες προστατεύουν από τις επιβλαβείς δράσεις των ελευθέρων ριζών, επάγοντας ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως μεταλλοθειονίνες οι οποίες μπορούν με την σειρά τους να δεσμεύουν μέταλλα όπως χαλκός και σίδηρος και να εμποδίσουν την περαιτέρω παραγωγή ελευθέρων ριζών (Ferguson, 2001).

Ακόμη, οι πολυφαινόλες έχει παρατηρηθεί ότι επάγουν τη δραστικότητα αλλά και την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η CAT, η SOD, η GR και η GPx (Nelson et

al., 2006; Breinhold et al., 1999). Η ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων να επηρεάζει την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων αποδίδεται στην ικανότητά τους να επιδρούν, άμεσα ή έμμεσα, στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element, ARE). Το ARE είναι μια αλληλουχία, η οποία βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων που σχετίζονται με την έκθεση των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες. Το ARE βρίσκεται σε υποκινητές των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους (Nguyen et al., 2003).

5.3. Προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων

Παρά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους, οι πολυφαινολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι έχουν δυαδικό ρόλο δρώντας και προοξειδωτικά (Halliwell, 2000, 2007). Η δράση αυτή οφείλεται στο ότι αντί να προστατεύουν από τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχουν με διάφορους τρόπους στον σχηματισμό τους, προάγοντας έτσι την οξείδωση διάφορων υποστρωμάτων (Black, 2004; Cotelle, 2001).

Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση και η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων αποτελεί έναν μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης. Οι ROS που παράγονται μέσω της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών μπορούν να οδηγήσουν στον κατακερματισμό του DNA που είναι ένας μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση. Έτσι οι πολυφαινόλες μέσω της προοξειδωτικής τους δράσης μπορούν να οδηγήσουν στην επαγωγή της απόπτωσης η οποία αποτελεί μηχανισμό που εμποδίζει την καρκινογενετική διαδικασία, δρώντας χημειοπροστατευτικά (Hadi et al., 2000; Ramos, 2007). Το γεγονός ότι πολλές ιδιότητες των πολυφαινολών, όπως η πρόκληση θραυσμάτων στο DNA και η παραγωγή ROS παρουσία μεταβατικών μετάλλων, είναι όμοιες με τις δράσεις γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων αποτελεί ένα ακόμη στοιχείο για την ευεργετική πλευρά της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών απέναντι στην καρκινογένεση (Galati & O’Brien, 2004; Hadi et al., 2007).

Η προοξειδωτική και η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων βρίσκεται σε μία ισορροπία. Η ισορροπία αυτή, εξαρτάται από την ικανότητά των πολυφαινολικών ενώσεων να ανάγουν και να δεσμεύουν χηλικά ιόντα μετάλλων και την ικανότητά τους να αντιδρούν με το O_2 (Sakihama et al., 2002). Ακόμη, η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι δομικά

χαρακτηριστικά των πολυφαινολών τα οποία είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι σημαντικά και για την προοξειδωτική τους δράση (Cao et al., 1997; Heim et al., 2002; Hansch et al., 2000). Ειδικότερα, η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών σχετίζεται με την αστάθεια των φαινολικών ριζών μετά την εξουδετέρωση των ROS, τη συγκέντρωση των φαινολικών ριζών και από την παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων.

Αστάθεια των φαινολικών ριζών

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών είναι η δημιουργία μιας οξειδοαναγωγικά ασταθούς φαινολικής ρίζας. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες συνήθως συνοδεύεται από τον σχηματισμό σταθερών φαινολικών ριζών ή ριζών που αντιδρούν με άλλες ρίζες και οδηγούν στον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων παραγωγής νέων ελευθέρων ριζών, με την δημιουργία αδρανών προϊόντων (Galati et al., 2002).

Υπάρχουν περιπτώσεις που όταν κάποια φλαβονοειδή δεσμεύουν μία ελεύθερη ρίζα, η φαινολική ρίζα που παράγεται, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να μην είναι σταθερή, να αντιδράσει με το μοριακό O_2 ή την GSH και να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών $O_2^{\bullet-}$ (Εικόνα 19). Η αντίδραση με το O_2 εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική ισχύ και τον χρόνο ημιζωής της φαινολικής ρίζας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής της φαινολικής ρίζας τόσο πιθανότερο είναι η ρίζα να αλληλεπιδράσει με το O_2 και να οδηγήσει στον σχηματισμό νέων ελευθέρων ριζών (Sakihama et al., 2002).

Οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ μετατρέπονται σε H_2O_2 το οποίο μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγεί στον σχηματισμό των ιδιαίτερα δραστικών ριζών $OH^{\bullet}$. Όταν η φαινολική ρίζα αντιδρά με την GSH την οξειδώνει και σχηματίζει μία θειϊκή ρίζα ($GS^{\bullet}$) η οποία αντιδρώντας με την γλουταθειόνη δίνει ένα δισουλφιδικό ριζικό ανιόν ($GSSG^{\bullet-}$) το οποίο ανάγει αμέσως το O_2 σε ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Εικόνα 19). Οι αντιδράσεις αυτές συμβαίνουν παρουσία υψηλής συγκέντρωσης μεταβατικών μετάλλων τα οποία καταλύουν τις παραπάνω αντιδράσεις (Cotelle, 2001).

$FL\text{-}O^{\bullet} + O_2 \rightarrow FL{=}O + O_2^{\bullet -}$ (Όπου $FL\text{-}O^{\bullet}$: μια φαινολική ρίζα)

$FL\text{-}O^{\bullet} + GSH \rightarrow GS^{\bullet} + FL\text{-}OH$

$GS^{\bullet} + GSH \rightarrow GSSG^{\bullet -}$

$GSSG^{\bullet -} + O_2 \rightarrow GSSG + O_2^{\bullet -}$

$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$H_2O_2 + Fe^{2+}$ (ή Cu^{+}) $\rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$ (ή Cu^{2+}) (Fenton)

Εικόνα 19: Αντιδράσεις αλληλεπίδρασης μιας φαινολικής ρίζας ($FL\text{-}O^{\bullet}$) με τη GSH.

Στην αστάθεια των φαινολικών ριζών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και η δομή των πολυφαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα οι υδροξυλομάδες στις θέσεις C3΄, C4΄ και C3 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 4) σταθεροποιούν την δομή των φαινολικών ριζών των φλαβονοειδών. Καθώς τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά είναι σημαντικά και για την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, αποτελούν ένα στοιχείο ρύθμισης της ισορροπίας ανάμεσα στην αντιοξειδωτική και προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών (Heim et al., 2002; Hansch et al., 2000).

Εκτός από την αντίδραση των πολυφαινολών με το O_2, φαινολικές ρίζες μπορούν να παραχθούν από την οξείδωση των πολυφαινολικών ενώσεων από τη δράση περοξειδασών (O'Brien, 2000). Περοξειδάσες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις πολυφαινόλες και οδηγούν στο σχηματισμό φαινολικών ριζών. Οι φαινολικές ρίζες που παράγονται κατ' αυτόν τον τρόπο δρουν προοξειδωτικά αντιδρώντας στη συνέχεια με τη GSH και οδηγούν στην παραγωγή ROS (Εικόνα 19) (Galati et al, 1999; Chan et al., 1999).

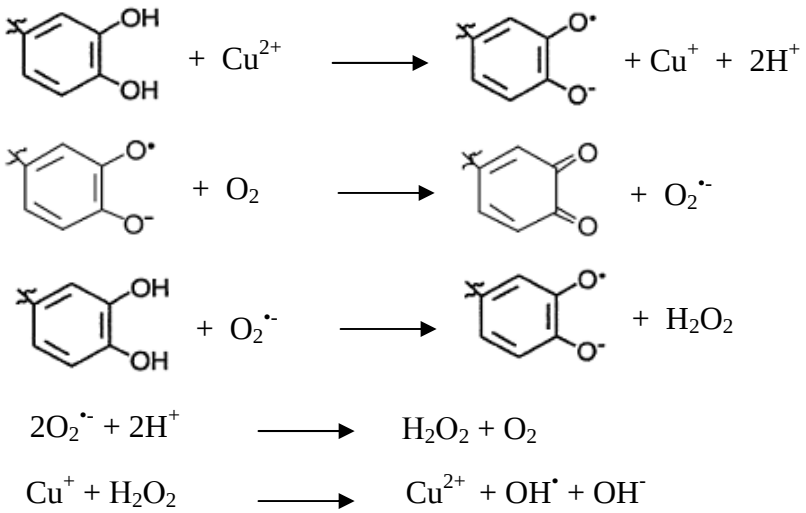
Ακόμη, μεγάλη σημασία στην προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων παίζει η συγκέντρωση των φαινολικών ριζών τους. Πολλές πολυφαινολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι έχουν ευεργετικές ιδιότητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικές ή δρουν προοξειδωτικά (hormesis) (Halliwell, 2000; Son et al., 2008; Mattson, 2008).

Αλληλεπίδραση με ιόντα μεταβατικών μετάλλων

Οι πολυφαινολικές ενώσεις έχει βρεθεί ότι δρουν ως προοξειδωτικά σε συστήματα που περιέχουν οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα. Ο μηχανισμός της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών περιλαμβάνει τη συμμετοχή ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. Παρουσία O_2, μέταλλα όπως ο χαλκός (Cu) και ο σίδηρος

(Fe), συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών, οι οποίες καταλήγουν σε σχηματισμό ROS και άλλων οργανικών ριζών οι οποίες είναι επιβλαβείς για τα βιομόρια (Sakihama et al., 2002; Halliwell, 2000). Ωστόσο, η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων εξισορροπείται από την ικανότητα που έχουν οι πολυφαινόλες να δεσμεύουν χηλικά τα ιόντα μετάλλων αλλά και από την ικανότητά τους να εμποδίζουν τον σίδηρο να βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή Fe^{2+} ώστε να μην μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001; Yoshino & Murakami 1998).

Οι πολυφαινόλες δρουν ως προοξειδωτικές ενώσεις, οδηγώντας στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών, μέσω της αντίδρασής τους με δισθενή ιόντα χαλκού Cu^{2+} (Sakihama et al., 2002; Galati & O'Brien, 2004). Αρχικά μια πολυφαινολική ένωση αντιδρά παρουσία ιόντων Cu^{2+} μαζί τους, τα οποία και ανάγει σε Cu^{+}. Η ίδια μετατρέπεται σε φαινολική ρίζα, η οποία με την σειρά της προσβάλει το O_2 και το μετατρέπει σε ρίζα $O_2^{\bullet -}$ (Εικόνα 20). Οι ρίζες $O_2^{\bullet -}$ με την σειρά τους αντιδρούν με μία νέα πολυφαινόλη, ανακυκλώνοντας την φαινολική ρίζα και σχηματίζοντας ρίζες H_2O_2. Το H_2O_2 μαζί με τα ιόντα Cu^{+} που παράχθηκαν από την πρώτη αντίδραση συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton και οδηγούν στον σχηματισμό ριζών $OH^{\bullet}$ που, όπως έχει αναφερθεί, είναι πολύ δραστικές και προκαλούν πολλές βλάβες στα κύτταρα (Sakihama et al., 2002; Galati & O'Brien, 2004). Ένας ακόμη μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης στον οποίο συμμετέχει ο χαλκός, είναι η άμεση πρόκληση βλαβών στο DNA από την άμεση αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τον Cu που είναι συνδεδεμένος με το DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει θεωρηθεί ότι προκαλεί βλάβες στο DNA, που περιλαμβάνουν οξειδωτική τροποποίηση των βάσεων, σπασίματα των κλώνων, και δημιουργία ομοιοπολικών συνδέσεων (adducts) στο DNA (Sakihama et al., 2002; Hadi et al., 2007).



Εικόνα 20: Αντιδράσεις μιας πολυφαινόλης με τα ιόντα Cu^{2+}. Οι αντιδράσεις αυτές αποτελούν έναν ακόμη μηχανισμό προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών οι οποίες μέσω της αντίδρασής τους με ιόντα Cu^{2+} οδηγούν στον σχηματισμό των ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου $OH^{\bullet}$.

5.4. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολικών ενώσεων

Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την αντιμεταλλαξιγόνο δράση πολυφαινολικών ενώσεων, σε διάφορα πειραματικά μοντέλα και απέναντι σε διαφορετικούς μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολικών ενώσεων τις καθιστά χημειοπροστατευτικούς παράγοντες, ιδιαίτερα ως παρεμποδιστές της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents). Εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας των μεταλλαξιγόνων παραγόντων και των μηχανισμών με τον οποίο οδηγούν στο σχηματισμό μεταλλάξεων, οι μηχανισμοί αντιμεταλλαξιγόνου των πολυφαινολικών ενώσεων δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί (Ferguson 2001; Shukla & Kumar Pal, 2004).

Αντιοξειδωτική δράση

Όπως προαναφέρθηκε οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται από τους σημαντικούς παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό και οδηγούν στη δημιουργία μεταλλάξεων. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν έναν μηχανισμό της αντιμεταλλαξιγόνου, χημειοπροστατευτικής δράσης τους (Shukla & Kumar Pal, 2004; Yang et al., 2001).

Επίδραση στη σύνθεση του DNA

Ένας πιθανός μηχανισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολών, είναι ότι έχουν την ικανότητα να μειώνουν τη σύνθεση του DNA, γεγονός που θεωρείται ότι μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία μεταλλάξεων. Έχει παρατηρηθεί ότι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάζουν την σύνθεση του DNA αλληλεπιδρώντας με αυτό είτε άμεσα είτε έμμεσα με την σύνδεσή τους με μέταλλα. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο οι πολυφαινόλες έχουν αυτή την ικανότητα δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός (Ferguson, 2001).

Επίδραση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

Εκτός από την πρόκληση μεταλλάξεων στο DNA, και η λειτουργικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA είναι καθοριστική για την καρκινογένεση. Ένας μηχανισμός αντιμεταλλαξιγόνου, χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων είναι η ικανότητα αύξησης της αποκατάστασης βλαβών στο DNA οι οποίες στην συνέχεια θα οδηγούσαν σε μεταλλάξεις. Έχει παρατηρηθεί ότι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν άμεσα τη δράση των ενζύμων επιδιόρθωσης ή να ρυθμίζουν την έκφρασή τους (Ferguson, 2001; Kudora & Hara, 1999).

Επίδραση στη δέσμευση των μεταλλαξιγόνων στο DNA

Πολλά μεταλλαξιγόνα προκειμένου να προκαλέσουν βλάβες στο γενετικό υλικό συνδέονται ομοιοπολικά με αυτό. Κάποιες πολυφαινόλες έχει παρατηρηθεί ότι εμποδίζουν την σύνδεση ορισμένων μεταλλαξιγόνων στο DNA και έτσι εμποδίζουν την δράση τους (Ferguson 2001).

Παρεμπόδιση της νιτροσυλίωσης

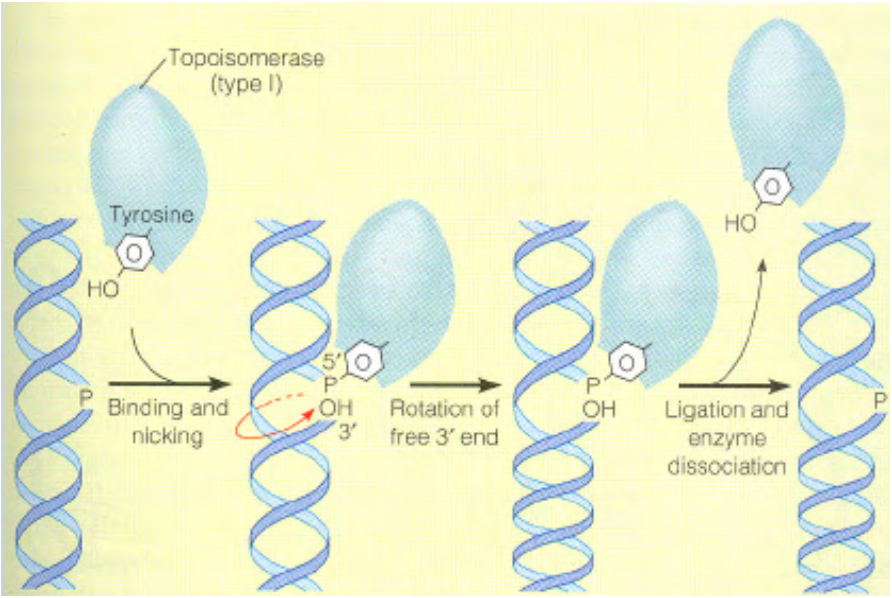
Οι N-νιτροσο ενώσεις, όπως η νιτροζαμίνη, θεωρούνται σημαντικές μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ενώσεις. Πολλές πολυφαινόλες μπορούν να έχουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση αναστέλλοντας την νιτροσυλίωση πολλών ενώσεων. Το καφεϊκό, το φερουλικό οξύ και οι κατεχίνες αποτελούν παραδείγματα πολυφαινολικών ενώσεων οι οποίες εμποδίζουν την μετατροπή πρόδρομων ενώσεων σε N-νιτρόσο ενώσεις, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του οργανισμού από την μεταλλαξιγόνο, δράση τους (Ferguson 2001; Kudora & Hara 1999).

5.5. Αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών

Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα τα οποία αλλάζουν τον αριθμό συνδέσεων του DNA καταλύοντας το πέρασμα των αλυσίδων του DNA μέσα από άλλες προκαλώντας μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα. Συγκεκριμένα, αφαιρούν τις υπερελικώσεις του DNA οι οποίες δημιουργούνται κατά τη διάρκεια πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως κατά την αντιγραφή και την μεταγραφή, διαχωρίζουν τις δίκλωνες αλυσίδες του DNA και εμπλέκονται στη γενωμική σταθερότητα (Wang, 1996). Αλλάζουν τον αριθμό των συνδέσεων του DNA καταλύοντας μια πορεία τριών βημάτων. Αρχικά πραγματοποιείται διάσπαση σε ένα σημείο της μιας ή και των δύο αλυσίδων του DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί πέρασμα του ενός τμήματος του DNA μέσω αυτού του σπασίματος και επανασυγκόλληση του σπασίματος. Οι τοποϊσομεράσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την πρωτοταγή τους μορφή, την τοποϊσομεράση I και II (Wang, 1996).

Η τοποϊσομεράση I, ανήκει στα ένζυμα τύπου I και προκαλεί τοπολογικές αλλαγές στο DNA μέσω παροδικής αποκοπής μιας DNA αλυσίδας κάθε φορά ώστε να επιτρέπει το πέρασμα μίας άλλης αλυσίδας. Συγκεκριμένα, η τοποϊσομεράση I προκαλεί ένα μονόκλωνο σπάσιμο στο DNA και ακινητοποιεί το 5΄ άκρο με ένα ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ μιας φωσφορικής ομάδας του DNA και ενός καταλοίπου τυροσίνης. Η περιστροφή του 3΄ άκρου ακολουθείται από απελευθέρωση του ενζύμου από την αλυσίδα DNA. Ακολουθεί επανασύνδεση της DNA αλυσίδας που διασπάστηκε (Εικόνα 21) (Pommier et al., 1998; Wang, 1996). Η τοποϊσομεράση II, ανήκει στα ένζυμα τύπου II και καταλύει DNA τοπολογικούς μετασχηματισμούς μέσω παροδικής αποκοπής ενός ζευγαριού συμπληρωματικών DNA αλυσίδων σε ένα διπλό τμήμα για να δημιουργήσει μία πύλη στο τμήμα για το πέρασμα μιας άλλης αλυσίδας. Η τοποϊσομεράση II απαιτεί την κατανάλωση ATP για την καταλυτική της δράση (Wang, 1996).

Έχει αποδειχτεί ότι οι τοποϊσομεράσες είναι αποτελεσματικοί χημειοθεραπευτικοί στόχοι αφού εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα καρκινικά κύτταρα. Καθώς τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και οι τοποϊσομεράσες αποτελούν καίρια ένζυμα για την αντιγραφή και την γενωμική σταθερότητα αποτελούν στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην δράση τόσο της τοποϊσομεράσης I και II θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί, χημειοπροστατευτικοί παράγοντες (Pommier, 1993; Wang et al., 1997).



Εικόνα 21: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης Ι. Μέσω του μηχανισμού αυτού, η τοποϊσομεράση Ι προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και αφαιρεί τις υπερελικώσεις στο DNA.

Οι αναστολείς των τοποϊσομερασών έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικοί χημειοθεραπευτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τους καταστολείς και τα “poisons” (Wang et al., 1997; Baily, 2000). Οι καταστολείς, αναστέλλουν την καταλυτική δράση των ενζύμων εμποδίζοντας κυρίως τη σύνδεση τους στο DNA. Τα poisons σταθεροποιούν τα παροδικά σπασίματα, που δημιουργούν τα ένζυμα για την απομάκρυνση των υπερελικώσεων και εμποδίζουν την ακόλουθη επανασύνδεση του αρχικού σπασίματος. Αυτό επιτυγχάνεται σταθεροποιώντας το ομοιοπολικό σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης Ι και ΙΙ με το DNA, που προκαλεί συνεχόμενα σπασίματα στο DNA (Wang et al., 1997; Froelich-Ammon & Osheroff, 1995).

Οι αναστολείς των τοποϊσομερασών, ιδιαίτερα τα poisons, λόγω της ικανότητάς τους να σταθεροποιούν το σύμπλοκο που προκαλεί τα σπασίματα στο DNA και μεταλλάξεις, αποτελούν σημαντικά αντινεοπλασματικά φάρμακα. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου που προκαλεί τα σπασίματα δεν είναι απαραίτητα κυτταροτοξική καθώς χρειάζονται και κάποια άλλα γεγονότα για να δημιουργηθούν τοξικές βλάβες στο DNA. Η δράση των αναστολέων, ενισχύεται από τα υψηλά επίπεδα των τοποϊσομερασών στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, λόγω του μεγαλύτερου ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (Ferguson, 2001; Wang et al., 1997). Ο σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-DNA-φάρμακο, όπου φάρμακο είναι ο αναστολέας της τοποϊσομεράσης μπορεί να συμβεί με τρείς τρόπους. Το φάρμακο μπορεί

να συνδέεται πρώτα στην τοποϊσομεράση και μετά να δημιουργείται το σύμπλοκο με το DNA, ή να συνδέεται πρώτα στο DNA και μετά να δημιουργείται το σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση ή να δημιουργείται πρώτα το σύμπλοκο τοποϊσομεράση-DNA και μετά σ' αυτό συνδέεται το φάρμακο (Froelich-Ammon & Osheroff, 1995; Pommier, 1993).

Εκτός από αντινεοπλασματικά φάρμακα, οι αναστολείς των τοποϊσομερασών αποτελούν σημαντικούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες, ως παρεμποδιστές της νεοπλασματικής ανάπτυξης, στα στάδια της προαγωγής και της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Πολλές πολυφαινολικές ενώσεις, ιδιαίτερα φλαβονοειδή δρουν είτε ως καταστολείς είτε ως poison απέναντι στην τοποϊσομεράση I και II (Constantinou et al., 1995; Gonzalez de Mejia et al., 2006; Lopez-Lazaro et al., 2002).

Μελέτες έδειξαν ότι, όμοια με την αντιοξειδωτική ικανότητα, οι υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C3, C7, C3΄ και C4΄ του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 4), μαζί με την 4-οξο-ομάδα και το διπλό δεσμό ανάμεσα στους C2 και C3 στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου C, είναι πολύ σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών για τις ανασταλτικές τους δράσεις απέναντι στις τοποϊσομεράσες (Constantinou et al., 1995; Bandele et al., 2008). Φλαβονοειδή που φέρουν αυτά τα χαρακτηριστικά δρουν ως ισχυρά Topo II poisons (Constantinou et al., 1995). Η δράση των φλαβονοειδών δεν είναι εξειδικευμένη και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την διερεύνηση των μηχανισμού δράσης τους είτε ως καταστολείς είτε ως poisons. Ακόμη είναι απαραίτητη η μελέτη της δράσης και άλλων πολυφαινολικών ενώσεων εκτός των φλαβονοειδών για τη δράση τους ως αναστολείς των τοποϊσομερασών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ελλαγικό οξύ ανέστειλε τη δράση και της τοποϊσομεράσης I και II (Constantinou, Stoner, et al., 1995). Ακόμη, τα φαινολικά οξέα καφεϊκό και πρωτοκατεχοϊκό οξύ παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση στην καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης I (Stagos et al., 2005).

5.6. Επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών

Όπως προαναφέρθηκε σημαντική κατηγορία των χημειοπροστατευτικών παραγόντων είναι οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου και οι παράγοντες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών (Johnson, 2007; Stoner et al., 1997). Η ρύθμιση της δράσης των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ενώσεων μπορεί να έχει επίδραση τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στην απέκκριση εξωγενών μεταλλαξιγόνων, καρκινογόνων παραγόντων. Οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν είτε εμποδίζοντας τον σχηματισμό του καρκινογόνου, μεταλλαξιγόνου παράγοντα,

είτε εμποδίζοντας την δράση του (Manson et al., 2000; Galati & O'Brien, 2004). Αυτό επιτυγχάνεται με την ιδιότητά τους να αναστέλλουν ένζυμα της φάσης Ι του μεταβολισμού, που συμβάλουν στην ενεργοποίηση πολλών προκαρκινογόνων, να επάγουν ένζυμα της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού, που συμβάλουν στην απομάκρυνση πολλών καρκινογόνων-μεταλλαξιγόνων παραγόντων, καθώς και με την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους (Ren et al., 2003; Galati & O'Brien, 2004).

Πολλά χημικά προκαρκινογόνα δεν είναι άμεσα καρκινογόνα αλλά πρέπει να μεταβολιστούν για να δώσουν τα τελικά καρκινογόνα (Reddy et al., 2003). Οι αντιδράσεις της φάσεις Ι αλλάζουν ή απομακρύνουν ενεργές ομάδες από το αρχικό μόριο της ουσίας μέσω οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές είναι το κυτόχρωμα P_{450}. Οι αντιδράσεις της φάσης ΙΙ προσθέτουν άλλες ομάδες στο μόριο μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό, θειικό κλπ. (Shukla et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων της φάσης Ι, δύο ισοενζύμων του P_{450}, του CYP1A1 και CYP1A2, που συμβάλουν στην ενεργοποίηση πολλών προκαρκινογόνων (Ren et al., 2003; Ferguson, 2001; Galati & O'Brien, 2004). Ακόμη, έχουν την ικανότητα να επάγουν την δράση και την έκφραση ενζύμων της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού, όπως η τρανφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και η UDP-γλυκουρόνυλο τρασφεράσης, τα οποία συμβάλουν στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών μεταλλαξιγόνων παραγόντων παρεμποδίζοντας έτσι την δράση τους στο γενετικό υλικό (Ferguson, 2001; Yu et al., 1997; Galati & O'Brien, 2004).

5.7. Παρεμπόδιση της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Στους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες κατατάσσονται και οι παράγοντες που παρεμποδίζουν τη νεοπλασματική ανάπτυξη, ιδιαίτερα στο στάδιο της προαγωγής αλλά και της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Οι πολυφαινολικές ενώσεις ότι δρουν ως παρεμποδιστές τις νεοπλασματικής ανάπτυξης με ποικίλους μηχανισμούς οι οποίοι αποτελούν σημαντικό αντικείμενο μελέτης (De Flora & Ferguson, 2005).

Επαγωγή της απόπτωσης

Μια από της σημαντικότερες χημειοπροστατευτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι η ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση (Ramos, 2007; Sun et al., 2004). Οι ιδιότητες αυτές έχουν παρατηρηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες (Sun et al., 2004; Galati et al., 2000). Έρευνες έχουν δείξει ότι

φλαβονοειδή μπορούν να επάγουν την απόπτωση επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι πολυφαινολικές ενώσεις επάγουν την απόπτωση δεν είναι πλήρως γνωστός (Ramos, 2007; Sun et al., 2004). Ένας ακόμη προτεινόμενος μηχανισμός, ο οποίος εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης, εμπεριέχει τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών. Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα οδηγούν στην απόπτωση και στον κατακερματισμό του DNA μέσω ελευθέρων ριζών (Hadi et al., 2007; Hail et al., 2008; Mates et al., 2000). Οι ROS που παράγονται μέσω της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών μπορούν να οδηγήσουν στον κατακερματισμό του DNA και στην απόπτωση. Έτσι οι πολυφαινόλες μέσω της προοξειδωτικής τους δράσης μπορούν να οδηγήσουν στην επαγωγή της απόπτωσης, δρώντας χημειοπροστατευτικά (Hadi et al., 2000; Ramos, 2007).

Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζονται με την αναστολή, την αντιστροφή ή την καθυστέρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Fresco et al., 2006; Ren et al., 2003). Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται κυρίως στην ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες που συμβάλλουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό. Ένας επιπλέον τρόπος καταστολής των μονοπατιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η μείωση της υπερέκφρασης των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων (Fresco, et al., 2006; Johnson, 2007).

Επαγωγή της διαφοροποίησης

Χαρακτηριστικό του καρκινικού φαινότυπου είναι ότι τα κύτταρα δεν έχουν ικανότητα περαιτέρω διαφοροποίησης. Η επαγωγή της διαφοροποίησης οδηγεί σε περιορισμό των καρκινικών κυττάρων και σε αποκατάσταση της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης. Ορισμένα φλαβονοειδή βρέθηκε ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η δράση αυτή αντικατοπτρίζει έναν ακόμη μηχανισμό, με τον οποίο συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Ren et al., 2003).

Αναστολή της αγγειογένεσης

Ένας άλλος μηχανισμός χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων αφορά στην αναστολή της αγγειογένεσης, η οποία παρατηρείται κατά την καρκινογένεση. Η δημιουργία νέων αγγείων από το προϋπάρχον μικροαγγειακό δίκτυο

συμβάλλει στη διείσδυση και μετάσταση του όγκου (Fresco et al., 2006; Shukla et al., 2004). Η αναστολή της αγγειογένεσης οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Τα φλαβονοειδή παρατηρήθηκε ότι παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης, όπως είναι η καταστροφή των αγγείων, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή ο σχηματισμός του αυλού (Ren, et al. 2003).

5.8. Άλλες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολικών ενώσεων

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, οι πολυφαινολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι έχουν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Nijveldt et al., 2001). Ακόμη, προστατεύουν από την οστεοπόρωση και από τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Soleas et. al., 1997; Nijveldt et al., 2001). Οι καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες οφείλονται κυρίως στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που αποτελούν γεγονότα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (Ferguson et al., 2001; Soleas et. al., 1997).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οι ευεργετικές επιδράσεις που έχει η κατανάλωση ψυχανθών σε χρόνιες παθήσεις και ιδιαίτερα σε ορισμένες μορφές καρκίνου, έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη των στοιχείων που είναι υπεύθυνα για αυτές τις επιδράσεις. Εκτός από τα κύρια διατροφικά συστατικά των ψυχανθών, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί και στις περιεχόμενες σε αυτά βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, οι οποίες θεωρείται ότι είναι οι κύριες υπεύθυνες ενώσεις για τις ευεργετικές ιδιότητες των ψυχανθών. Η πλειοψηφία των βιοδραστικών πολυφαινολικών ενώσεων και των αντιδιατροφικών παραγόντων έχει μελετηθεί κυρίως στους σπόρους και τους καρπούς διάφορων ψυχανθών, λόγω της σημασίας των διατροφικών τους επιδράσεων.

Οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν σημαντικούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Ωστόσο, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν ποσοτικά οι χημειοπροστατευτικές δράσεις των ψυχανθών. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία των ψυχανθών, στο γεγονός ότι καταναλώνονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης, με αποτέλεσμα να υπάρχει πολύ μεγάλη ετερογένεια στη χημική τους σύσταση και στην επεξεργασία που υπόκεινται ώστε να καταναλωθούν. Ακόμη, το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις ποικιλίες των ψυχανθών καθώς και μεγάλη ποικιλομορφία στην σύστασή τους σε φυτοχημικές ενώσεις, καθιστά σημαντική τη διεξαγωγή ερευνών πάνω στις βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα ψυχανθή καθώς και τις βιολογικές τους ιδιότητες. Γι’ αυτό το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις καθώς και στις ιδιότητες των επιμέρους πολυφαινολικών ενώσεων.

Στα παραπάνω πλαίσια, η παρούσα μελέτη εξέτασε τις βιολογικές ιδιότητες 34 φυτικών εκχυλισμάτων από διάφορες ελληνικές ποικιλίες και τμήματα ψυχανθών. Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν οι εξής:

1. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών, ως πιθανών πηγών βιοδραστικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων, με διάφορες δοκιμές *in vitro*.
2. Απομόνωση και ταυτοποίηση των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων και μελέτη των χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων τους.
3. Μελέτη της δράσης δραστικών εκχυλισμάτων και καθαρών βιοδραστικών μορίων σε κυτταρικά και ενζυμικά συστήματα καθώς και παρατήρηση της σημασίας των δραστικών συγκεντρώσεων στα συστήματα αυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

1. Γένη και είδη των ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 11 ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae/Fabaceae*. Τα φυτά συλλέχθηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας και ταυτοποιήθηκαν. Τα φυτά ανήκουν στα γένη *Phaseolus*, *Vicia*, *Lens*, *Lathyrus*, *Lotus* και *Lupinus* (Πίνακας 4) (National Plant Database).

Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός των ειδών των ψυχανθών που εξετάστηκαν

Γένος	Είδος	Κοινή ονομασία	Προέλευση
Phaseolus	*Phaseolus vulgaris*	κοινό φασόλι	Βροντού, Σέρρες
Vicia	*Vicia faba*	κουκιά	εμπορική ποικιλία
	Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	άγριο είδος κουκιά (αγριάχυρο)	όρος Κυλλήνη
Lens	*Lens culinaris*	φακή	εμπορική ποικιλία
Lathyrus	*Lathyrus clymenum*	φάβα Σαντορίνης	τοπική ποικιλία των παραγωγών της Σαντορίνης
	Lathyrus sativus	λαθούρι «φάβα»	καλλιέργεια του νομού Βοιωτίας
	Lathyrus laxflorus subsp. *laxiflorus*	άγριο είδος λαθουρι	Ζαρός, Κρήτη
Lotus	*Lotus edulis*	περατζούνι, λώτος	Ζαρός, Κρήτη
	Lotus longisiliquosus	λώτος	όρος Χιονοβούνι
	Tetragonolobus purpureus	σανταλίδα	Ζαρός, Κρήτη
Lupinus	*Lupinus albus*	λούπινο	Ν. Πελοπόνησσος, πρόποδες Υμηττού

Phaseolus

Το γένος *Phaseolus* περιλαμβάνει περίπου 50 είδη φυτών τα οποία προέρχονται από την Ν. Αμερική. Το πιο χαρακτηριστικό είδος είναι το κοινό φασόλι, *Phaseolus vulgaris*, το οποίο είναι μονοετές και καλλιεργείται για τους εδώδιμους καρπούς του. Το είδος των κοινών φασολιών *Phaseolus vulgaris* αποτελείται από πολλές ποικιλίες που καλλιεργούνται ευρέως σε όλο τον κόσμο και διαφέρουν στο σχήμα, χρώμα και μέγεθος του καρπού. Καλλιεργείται σε τροπικά, ημιτροπικά και ήπια κλίματα όπως στην Ελλάδα όπου υπάρχουν πολλές τοπικές ποικιλίες (Στεφανάκη, 1999).

Vicia

Το γένος *Vicia* περιλαμβάνει 140 ανθοφόρα φυτά, τα οποία προέρχονται από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική. Αποτελείται από αρκετά αυτοφυή είδη αλλά και καλλιεργούμενα υβρίδια για παραγωγή εδώδιμων καρπών ή κτηνοτροφής (Στεφανάκη, 1999). Το είδος *Vicia faba* θεωρείται ότι προέρχεται από την Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία το οποίο καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό σε όλη την Ευρώπη. Είναι ετήσιο φυτό και οι καρποί των φυτών *Vicia faba* είναι γνωστοί ως κουκιά, τα οποία είναι εδώδιμα. Είναι μονοετή ποώδη φυτά που καλλιεργούνται από την προϊστορική εποχή στην Ευρώπη. Το είδος *Vicia tenuifolia* subsp. *stenophylla* αποτελεί το άγριο είδος κουκιών και καλλιεργείται ιδιαίτερα στη Βόρεια, Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη. Είναι πολυετές φυτό συναντάται σε ορεινές περιοχές και οι καρποί του είναι εδώδιμοι (Παπακώστα, 2005).

Lens

Το είδος *Lens culinaris* είναι φυτό ετήσιο και καλλιεργείται για τους εδώδιμους καρπούς του, τις φακές. Η καλλιέργεια της φακής κατάγεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία. Από την Τουρκία διαδόθηκε στην περιοχή του Νείλου, την Ελλάδα και την Ν. Ευρώπη. Ο ξηρός καρπός του χρησιμοποιείται ως όσπριο ενώ ως ζωοτροφή χρησιμοποιούνται τα υπολείματα του φυτού που μένουν μετά τον αλλωνισμό (Cubero, 1981; Παπακώστα, 2005).

Lathyrus

Το γένος *Lathyrus* αποτελείται από περίπου 187 είδη και υποείδη. Είδη του γένους αυτού χρησιμοποιούνται και ως καρποδοτικά και ως κτηνοτροφικά φυτά. Ως κέντρα καταγωγής θεωρούνται η περιοχή της Μεσογείου, η Κεντρική και η Ανατολική Ασία (Allkin et al. 1983). Το είδος *Lathyrus sativus* είναι το κοινό εδώδιμο λαθούρι. Είναι ετήσιο ποώδες φυτό, καλλιεργούμενο για τα σπέρματά του τα οποία φέρονται στο εμπόριο με το όνομα «φάβα». Χρησιμοποιείται είτε ως κτηνοτροφικό φυτό είτε για την παραγωγή εδώδιμων λαθουριών (Παπακώστα, 2005). Το είδος *Lathyrus laxflorus* subsp. *laxiflorus* αποτελεί ένα άγριο είδος λαθουριού. Το είδος *Lathyrus clymenum* διαφέρει από το *Lathyrus sativus* και φύεται μόνο στη Σαντορίνη και είναι αυτό που παράγει την χαρακτηριστική φάβα Σαντορίνης (Pastor-Cavada et al., 2010).

Lotus

Το γένος *Lotus* περιλαμβάνει αυτοφυή και καλλιεργούμενα φυτά. Το είδος *Lotus edulis* είναι γνωστό ως περατζούνι. Είναι ένα ετήσιο φυτό που φύεται κυρίως στη Μεσσόγειο και ιδιαίτερα στην Ιταλία, στην Ισπανία και στην Ελλάδα. Το είδος *Lotus longisiliquosus* ή *Lotus collinus* φύεται μόνο στην Ισπανία και στην Ελλάδα. Το είδος *Tetragonolobus purpureus* ανήκει στο γένος *Lotus* και είναι γνωστό ως σανταλίδα και φύεται κυρίως στην Ν. Ευρώπη.

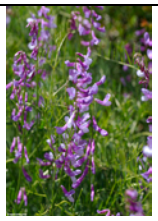
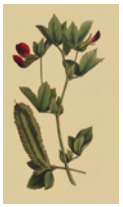
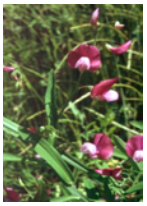
Lupinus

Στο γένος *Lupinus* ανήκουν περισσότερα από 300 είδη άγρια και καλλιεργούμενα. Περιλαμβάνει ποώδη ετήσια και ποώδη-θαμνώδη πολυετή φυτά. Τα περισσότερα είδη είναι αμερικανικής προέλευσης. Είναι τα κοινά λούπινα. Το είδος *Lupinus albus* είναι το φυτό που παράγει τα λευκά λούπινα εξαιτίας του λευκού χρώματος των καρπών. Καλλιεργούνται κυρίως στη Μεσσόγειο και για τους εδώδιμους καρπούς τους αλλά και ως κτηνοτροφικά φυτά (Huyghe, 1997; Παπακώστα, 2005).

2. Φυτικά εκχυλίσματα Ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*

Από τα 11 φυτά απομονώθηκαν συνολικά 34 εκχυλίσματα 17 υδατικά και 17 μεθανολικά. Τα φυτά και τα τμήματα των φυτών από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* και τμήματα των φυτών από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα

Φυτά	Τμήματα των φυτών	Φυτά	Τμήματα των φυτών
Vicia faba (κουκιά)	  Πόα*	*Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (λαθούρι)	  Πόα
Phaseolus vulgaris (φασόλι)	  Πόα		 Σπέρματα
	 Σπέρματα	*Lupinus albus* (λούπινο)	 Περικάρπιο
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla* (κουκιά)	  Πόα		  Πόα
	 Καρποί	*Lotus longisiliquosus* (λώτος)	  Πόα
Lens culinaris (φακές)	  Πόα	*Tetragonolobus purpureus* (σανταλίδα)	  Πόα
	 Σπέρματα		 Καρποί
Lathyrus clymenum (φάβα Σαντορίνης)	  Πόα	*Lotus edulis* (περατζούνι)	  Πόα
Lathyrus sativus (λαθούρι)	  Πόα		 Καρποί

*Πόα: υπέργεια τμήματα των φυτών.

2.2. Μέθοδοι

1. Διαδικασία απόκτησης των φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών

Η απομόνωση και επεξεργασία των φυτικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων με υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Αλέξανδρο-Λέανδρο Σκαλτσούνη. Τα υπέργεια τμήματα, τα σπέρματα και οι καρποί των φυτών (Πίνακας 5), μετά τη συλλογή τους αποξηρανθήκαν σε μεγάλους καλά αεριζόμενους χώρους, προστατευμένους από την ηλιακή ακτινοβολία και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διαλογή του φυτικού υλικού, μακρομερής τεμαχισμός και κονιορτοποίηση του σε ειδικό μύλο (Allenwest, UK).

Ποσότητα των τμημάτων φυτών χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v) σε ειδική συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (accelerated solvent extractor). Η παρασκευή των εκχυλισμάτων έγινε υπό καθορισμένες συνθήκες (ποσότητα φυτικού υλικού, πίεση, θερμοκρασία, όγκος διαλύτη και διάρκεια εκχύλισης) με σκοπό την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας για να υπάρχει η δυνατότητα της συγκριτικής μελέτης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη (μεθανόλη ή νερό) επαναλήφθηκε τρεις φορές και διαρκούσε 48 h. Στα δοχεία εκχύλισης της συσκευής τοποθετήθηκαν 20 g του φυτικού υλικού και η κάθε εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε πίεση 1500 psi, σε θερμοκρασία 70°C και σε 100 mL όγκο διαλύτη. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα ο διαλύτης απομακρύνθηκε με τη βοήθεια συσκευής απόσταξης υπό κενό, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα λυοφιλοποιήθηκαν μετά από ψύξη.

Η ξηρή ποσότητα των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό ή μεθανόλη για την πραγματοποίηση των *in vitro* δοκιμών. Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό. Μόνο τρία μεθανολικά εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε 10-20% μεθανόλη. Συνολικά 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα προέκυψαν από τα διάφορα τμήματα των 11 φυτών και μελετήθηκαν για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Πίνακες 4, 5).

2. Απομόνωση, κλασματοποίηση και ταυτοποίηση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων από τα εκχυλίσματα

Για τον προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων, δύο μεθανολικά εκχυλίσματα επιλέχθηκαν για κλασματοποίηση και ταυτοποίηση των πολυφαινολικών συστατικών τους. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε επίσης, στο τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων. Αρχικά έγινε χρωματογραφικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), σε πλάκες αλουμινίου και υάλου, τόσο κανονικής όσο και αντιστρόφου φάσεως. Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφορα συστήματα διαλυτών (διχλωρομεθάνιο /μεθανόλη και μεθανόλη /νερό), ενώ μετά την παρατήρησή τους στο ορατό και σε λάμπα UV (σε μήκη κύματος 254 και 365 nm) ακολούθησε η εμφάνισή τους με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης. Από τη μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι τα παραγόμενα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φυσικά προϊόντα που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών, με απορρόφηση και στα δύο μήκη κύματος και πορτοκαλοκίτρινη χροιά μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος (Andersen & Markham, 2006).

Η TLC πραγματοποιήθηκε σε πλάκες silica 60 F_{254} (Merck, Darmstadt, Germany). Η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (fast centrifugal partition chromatography, FCPC) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης CPC KROMATON 1000 mL, με ρυθμιζόμενη περιστροφή στα 200-2000 rpm και με μια αντλία Lab Alliance υπό πίεση με όριο ασφαλείας στα 50 bars. Μια μη αυτόματη βαλβίδα έγχυσης δείγματος χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των δειγμάτων στη στήλη. Μία συσκευή αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) τύπου Thermo Finnigan εφαρμόστηκε με τη χρήση μιας αντλίας SpectraSystem P4000, ενός συστήματος απαερίωσης SpectraSystem 1000, ενός αυτόματου δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000 και ενός ανιχνευτή UV SpectralSystem UV2000. Τα φάσματα NMR καταγράφονται σε φασματογράφο Bruker AC200 και Bruker DRX 400. Οι χημικές μετατοπίσεις (τιμές δ) προσδιορίστηκαν ως προς τετραμεθυλοσιλάνιο TMS ως δείγμα αναφοράς. Τα 2-D πειράματα (COSY, COSY LR, HMQC, HMBC, TOCSY και NOESY) πραγματοποιήθηκαν με την χρήση μικρο-προγραμμάτων Brucker. Οι μετρήσεις μάζας (ESMS) έγιναν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Nermag R 10 10C.

Πιο αναλυτικά, η σκόνη των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* (0,890 kg) και του *Lotus edulis* (0,490 kg) εκχυλίστηκε διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη και νερό. Η εκχύλιση με κάθε διαλύτη (3 × 5 L) επαναλήφθηκε τρεις φορές. Κάθε εκχύλιση

διαρκούσε 48 ώρες. Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* (48,1 g) υπέστη επεξεργασία με ρητίνη XAD-4 για το διαχωρισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών του (12,4 g). Ένα μέρος αυτού του κλάσματος (12 g) υπέστη διαχωρισμό με CPC χρησιμοποιώντας ένα μίγμα EtOA*c/n*-BuOH/H_2O (2:1:3) σε διφασικό σύστημα. Ο διαχωρισμός έγινε σε ταχύτητα 1000 rpm. Αρχικά, η κατώτερη στιβάδα ήταν η κινητή φάση (με βάση το νερό) ενώ η ανώτερη στιβάδα ήταν η σταθερή φάση (ρυθμός ροής 15 mL/min). Το έκλουσμα της στήλης συλλέχθηκε σε δείγματα των 30 mL και τελικά παράχθηκαν 11 κλάσματα (Vf A-L). Ακολούθως, συλλέχθηκαν το οργανικό στρώμα και 5 ακόμη κλάσματα (Vf M-Q). Παρομοίως, ένα τμήμα του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis* (12 g) υπέστη διαχωρισμό με FCPC χρησιμοποιώντας ένα μίγμα επτάνιο/EtOAc/MeOH/H_2O (1:4:1:4) σε διφασικό σύστημα. Ο διαχωρισμός έγινε σε ταχύτητα 1100 rpm. Αρχικά, η κατώτερη στιβάδα ήταν η κινητή φάση (με βάση το νερό) ενώ η ανώτερη στιβάδα ήταν η σταθερή φάση (ρυθμός ροής 15 mL/min). Το έκλουσμα της στήλης συλλέχθηκε σε δείγματα των 30 mL και τελικά παράχθηκαν 9 κλάσματα (Le A-I). Ακολούθως, το υδατικό στρώμα ήταν η κινητή φάση και συλλέχθηκαν 6 κλάσματα (Le K-P).

Όλα τα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα δύο εκχυλίσματα φυτών μελετήθηκαν με TLC και HPLC χρησιμοποιώντας μία στήλη Lichrosorb RP18 διαστάσεων 250 × 4,0 mm (BIRSHOFF Chromatography, Loenberg, Germany). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 2% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος (διαλύτης A) και από ακετονιτρίλιο (διαλύτης B). Συνθήκες: αρχικά A/B (95:5), σε 70 min A/B (75:25) και επιστροφή στις αρχικές συνθήκες. Ρυθμός ροής 1 mL/min. Ο περαιτέρω καθαρισμός των ουσιών έγινε με τη χρήση HPLC. Για τη εύρεση της χημικής δομής και την ταυτοποίηση των απομονωμένων καθαρών μορίων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), υπερύθρου (IR) και η φασματομετρία μάζας (MS). Στις μελέτες NMR έγιναν πειράματα συντονισμού πρωτονίου (^{1}H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR), μιας (1D) και δύο (2D) διαστάσεων, με διαφορετικές αλληλουχίες παλμών (DEPT, NOESY κλπ.) προκειμένου να καθοριστεί πλήρως τόσο η δομή, όσο και η στερεοχημεία του κάθε μορίου. Όλα τα γνωστά προϊόντα επιβεβαιώθηκαν με σύγκριση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

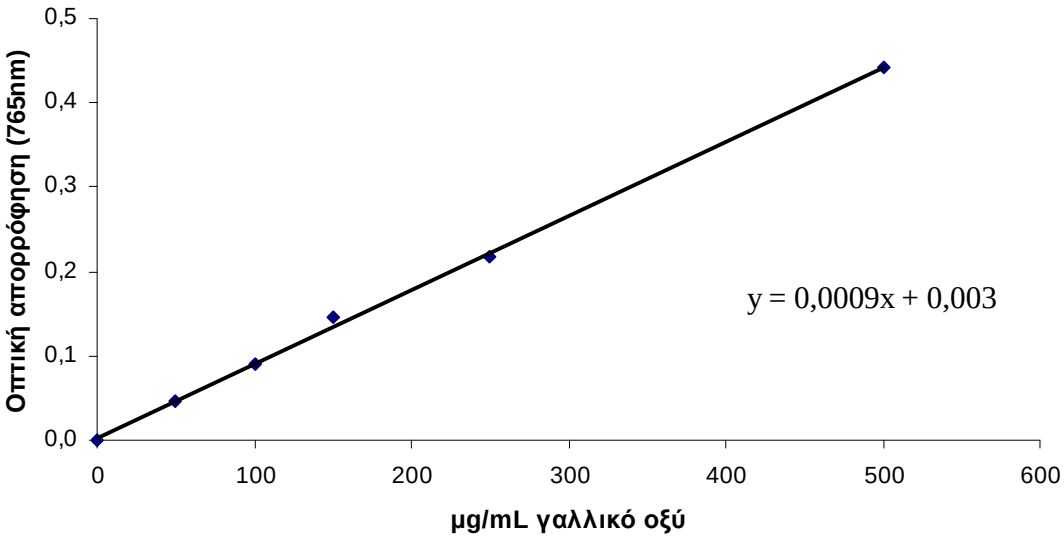
3. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) (Vermeris & Nicholson, 2006; Singleton & Rossi, 1965). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3, αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Σε σωληνάρια falcon των 15 mL προστίθενται απιονισμένο νερό όγκου 5 mL και 100 μL του προς εξέταση δείγματος, φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος. Στο τυφλό προστίθενται 100 μL απιονισμένου H_2O. Στην συνέχεια προστίθενται 500 μL του αντιδραστηρίου FC. Τα δείγματα ανακινούνται και μετά την πάροδο 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 1,4 mL διαλύματος Na_2CO_3 25% w/v. Το μίγμα ανακινείται. Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου στα 10 mL με απιονισμένο νερό. Το μίγμα ανακινείται ξανά και επωάζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500 (San Jose, USA) ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Εξετάστηκε ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραίωση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250 και 500 μg/mL γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 0{,}0009x + 0{,}003$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman r =0,998 με $p<0{,}01$ (Εικόνα 22). Το

συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος.



Εικόνα 22: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με ελεύθερες ρίζες

Αντιδραστήρια

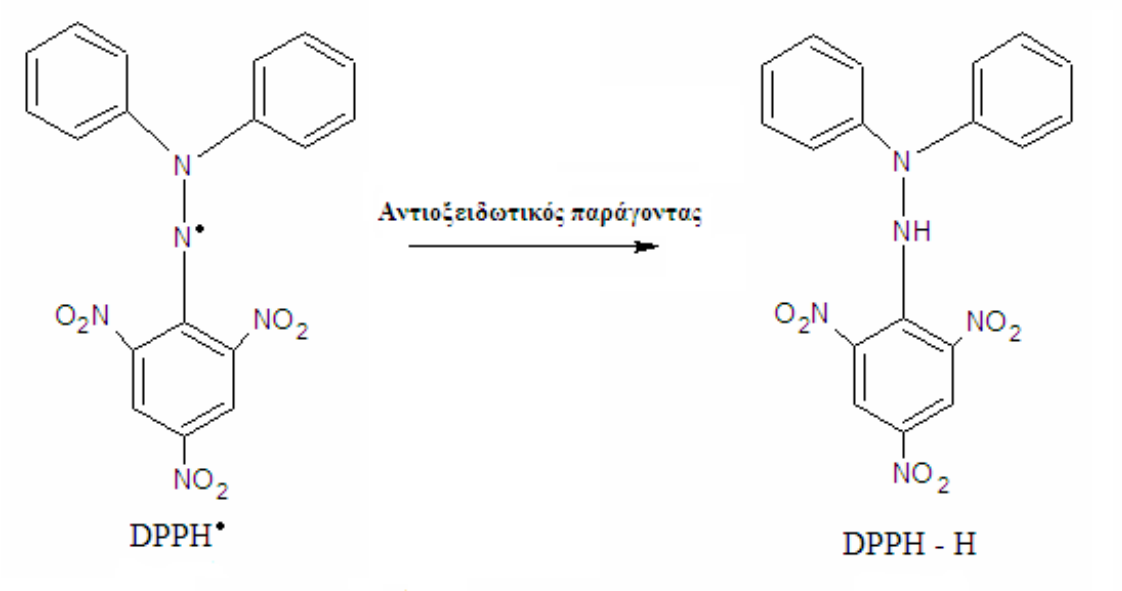
Τα χημικά αντιδραστήρια 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζίλιο (1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl, DPPH$^{\bullet}$), 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (2,2΄-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid), ABTS), Nitro blue tetrazolium (NBT) και τα ένζυμα περοξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) και οξειδάση της ξανθίνης από γάλα βοοειδών (xanthine oxidase, XO) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

4.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH$^{\bullet}$

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH$^{\bullet}$ πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brad-Williams et al. (Brad-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH$^{\bullet}$). Η ρίζα DPPH$^{\bullet}$ μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε

ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH$^{\bullet}$) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (Εικόνα 23).

Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, η αντίδραση με την ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH$^{\bullet}$ και το φυτικό εκχύλισμα, το κλάσμα και η καθαρή πολυφαινολική ένωση (δείγμα) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή πολυφαινολική ένωση μόνα τους σε μεθανόλη, αποτελούσε το τυφλό και η ρίζα DPPH$^{\bullet}$ (100 μM) σε μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα και καθαρή πολυφαινολική ένωση που εξετάστηκε.



Εικόνα 23: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH$^{\bullet}$) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων $DPPH^{\bullet}$ (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο. Ως δείκτης ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαΐνη καθώς είναι γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τη ρίζα $DPPH^{\bullet}$ (Visioli et al, 1998; Kruk et al., 2005).

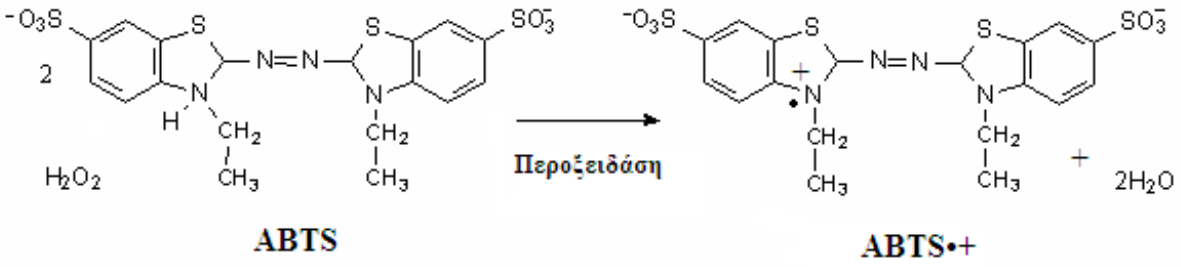
4.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας $DPPH^{\bullet}$, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα $DPPH^{\bullet}$, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του 2,2΄-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS). Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Cano et al., 1998; Arnao et al., 2001). Η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP,

παρουσία H_2O_2 (Εικόνα 24). Η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 1 mM ABTS, 30 μM H_2O_2 και 6 μM περοξειδάση. Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστίθενται οι συγκεντρώσεις του εξεταζόμενου δείγματος. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H_2O με 1 mM ABTS, 30 μM H_2O_2 αποτελούσε το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το καθένα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο. Ως δείκτης ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαΐνη καθώς είναι γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Kruk et al., 2005).

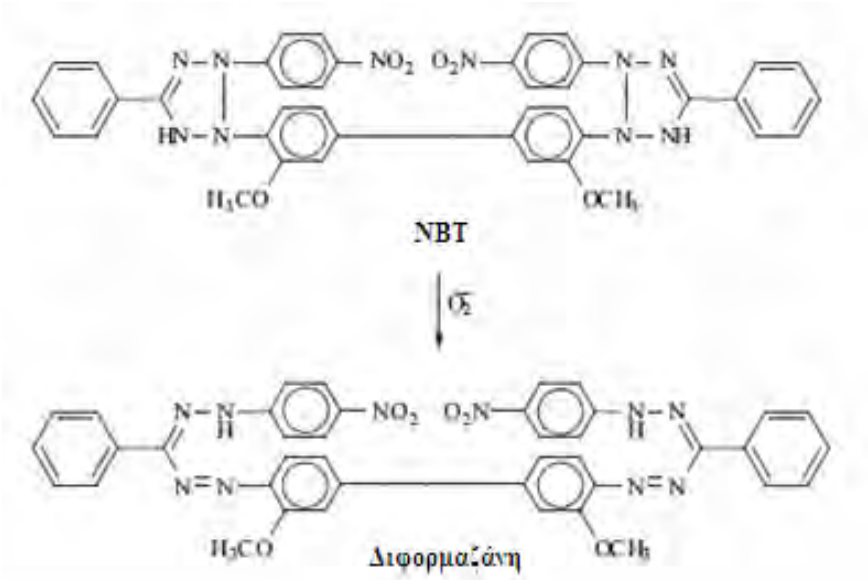


Εικόνα 24: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

4.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$

Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή ριζών $O_2^{\bullet-}$ από την αντίδραση της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη και την αναγωγή του NBT (nitro blue tetrazolium) από τις παραγόμενες ρίζες. Το NBT έχει κίτρινο χρώμα και παρουσία των ριζών $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται. Η ανηγμένη του μορφή, η διφορμαζάνη (diformazan) έχει μπλε χρώμα και απορροφά στα 540 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία (εκχύλισμα, κλάσμα ή καθαρή πολυφαινόλη) η οποία έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις ρίζες $O_2^{\bullet}$ παρατηρείται μείωση της αναγωγής του NBT σε διφορμαζάνη και μείωση της παραγωγής του μπλε χρώματος (Εικόνα 25). Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την επίδραση των εξεταζόμενων δειγμάτων στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Cos et al., 1998). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου εμποδίζουν το σχηματισμό των ριζών και δίνουν ψευδή αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων απέναντι στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ επιλέγονται συγκεντρώσεις οι οποίες δεν επηρεάζουν την παραγωγή των ριζών $O_2^{\bullet-}$ στο σύστημα της ξανθίνης και οξειδάσης της ξανθίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 500 μL στα οποία περιέχονται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου και νατρίου (33 mM με pH 7,5 και 0,1 mM EDTA), 0,2 mM NBT (50 μL), ξανθίνη 4,8 μM (80 μL) και το εξεταζόμενο δείγμα (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 43 munits οξειδάσης της ξανθίνης. Τα δείγματα αναμειγνύονται και επωάζονται για 20 min στους 37°C. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 500 μL HCl 2,5 N και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 nm. Τα δείγματα χωρίς το προς εξέταση δείγμα αποτελούν το μάρτυρα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε όλα τα συστατικά της αντίδρασης χωρίς το ένζυμο αποτελούσε το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε δείγμα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο. Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων ψυχανθών επηρεάζει τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μg/mL.



Εικόνα 25: Χημική δομή και αναγωγή του NBT σε διφορμαζάνη.

4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα (radical scavenging capacity, RSC) των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό εξουδετέρωσης της κάθε φορά ρίζας, το οποίο απεικονίζεται ως το ποσοστό μείωσης της οπτικής απορρόφησης της ρίζας. Το ποσοστό εξουδετέρωσης απεικονίζεται ως το ποσοστό μείωσης της οπτικής απορρόφησης της ρίζας στα 517 nm και 730 nm για τις ρίζες $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ αντίστοιχα καθώς και της ανηγμένης μορφής του NBT στα 540 nm. Υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση των ριζών} = [(A_0 - A_\delta)/A_0] \times 100$$

A_0: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση).

Για την σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} η οποία αποτελεί τη συγκέντρωση του δείγματος που οδηγεί σε εξουδετέρωση των ριζών κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του δείγματος.

5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση θραυσμάτων στο DNA

Αντιδραστήρια

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια 2,2΄-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH), το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNAse) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το διάλυμα H_2O_2 30% (w/v) αποκτήθηκε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany) και το θρεπτικό μέσο LB broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barchelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

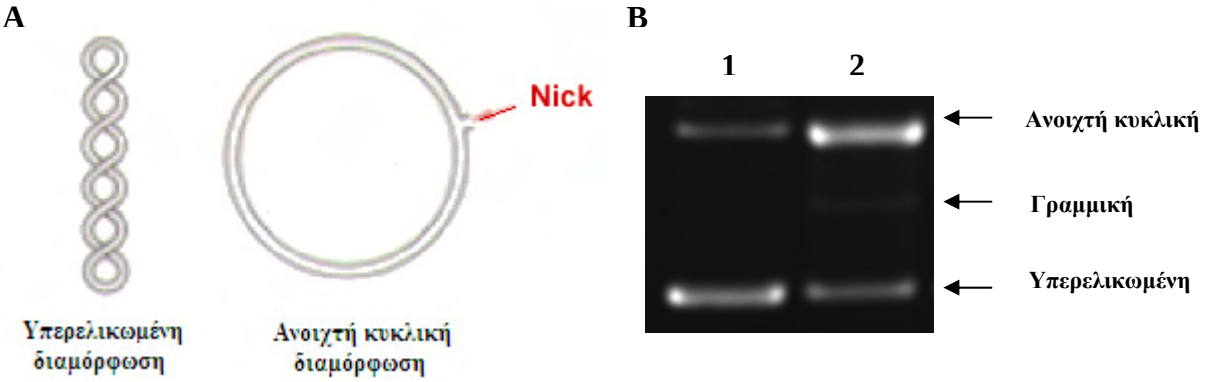
5.1. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)

Η μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες) και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται στο ότι το πλασμιδιακό DNA έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του. Οι διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA, λόγο του διαφορετικού τους

μεγέθους, έχουν την ιδιότητα να τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση. Οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA είναι οι εξής:

1. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμιδιακό DNA είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
2. Η ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA.
3. Η γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα (Εικόνα 26).

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αγαρόζης. Επομένως η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική (Εικόνα 26). Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων (φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών ουσιών) απέναντι στην ικανότητα ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 26: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (**A**) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks). (B) Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (20% ανοιχτή κυκλική και 80% υπερελικωμένη διαμόρφωση). Στήλη 2. πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (30% ανοιχτή κυκλική, 6% γραμμική και 64% υπερελικωμένη διαμόρφωση).

5.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 μg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται πολύ απαλά 4-5 φορές. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 ((100 mL) 5 M οξικό κάλιο $C_2H_3O_2K$, 11,5 mL οξικού οξέος). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214 g στους 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (-20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, ένζυμο RNAse 10 μg/mL).

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 μg/mL (1OD_{260}→50 μg/mL). Για τον

προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγμα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφηση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

5.3. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες $OH^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ βασίζεται στη μέθοδο των Keum et al. (2000). Με βάση τη μέθοδο, οι ρίζες $OH^{\bullet}$ παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H_2O_2 (Εικόνα 27). Η ικανότητα των ριζών να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από υπερελικωμένη, σε ανοιχτή κυκλική και γραμμική. Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση.

$$H_2O_2 \xrightarrow{UV\,\alpha\kappa\tau\iota\nu o\beta o\lambda\acute{\iota}\alpha} 2OH^{\bullet}$$

Εικόνα 27: Αντίδραση φωτόλυσης του H_2O_2 από UV ακτινοβολία.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 μL. Στο μίγμα της αντίδρασης περιέχονται 1 μg (2 μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl και 1 mM EDTA (pH 8), το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 40 mM H_2O_2 (2 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2 τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται κάτω από μια λάμπα UV ακτινοβολίας 300 W (OSRAM) για 3 min σε απόσταση 50 cm. Μετά την επώαση η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε

ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min. Για κάθε πείραμα, το δείγμα το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο μαζί με 40 mM H_2O_2 αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδίου.

Ακολουθεί φωτογράφηση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) και έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα, για τον προσδιορισμό της % αναστολής της δράσης των ριζών στο DNA. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμαζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική παρουσία των ριζών $OH^{\bullet}$. Ως δείκτης ισχυρής ικανότητας αλληλεπίδρασης με τις ρίζες $OH^{\bullet}$ χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαΐνη (Kruk et al., 2005).

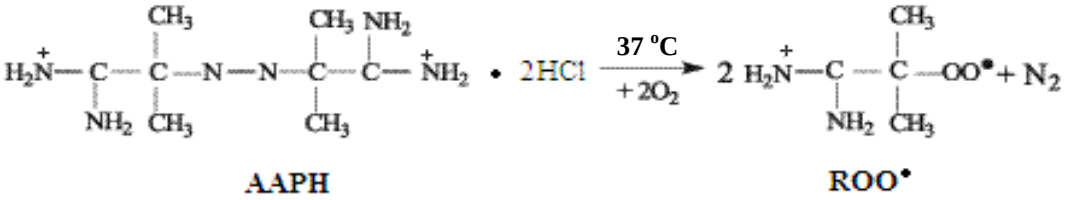
Ο χρόνος έκθεσης, 3 min, στην UV ακτινοβολία παρουσία 40 mM H_2O_2 επιλέχθηκε μετά από δοκιμή διάφορων χρόνων έκθεσης (0,5-10 min) σε απόσταση 50 cm από τη λάμπα UV ακτινοβολίας. Η έκθεση για 3 min σε UV ακτινοβολία παρουσία 40 mM H_2O_2 προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 60-80% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση. Ακόμη η έκθεση για 3 min μόνο σε UV ακτινοβολία και μόνο σε 40 mM H_2O_2 δεν επηρεάζει την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA. Η μεθανόλη σε συγκεντρώσεις ≥0,1% και το DMSO σε συγκεντρώσεις ≥0,05% έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $OH^{\bullet}$. Έτσι τα δείγματα που ήταν διαλυμένα σε αυτούς τους διαλύτες και οι τελικές τους συγκεντρώσεις υπερβαίνουν τα παραπάνω όρια δεν δοκιμάστηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο λόγο ψευδών θετικών αποτελεσμάτων που οφείλονται στο διαλύτη και όχι στο δείγμα.

5.4. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001). Με βάση τη μέθοδο, οι ρίζες περοξυλίου ROO• παράγονται από την θερμική διάσπαση της ένωσης AAPH (Εικόνα 28). Οι ενώσεις που έχουν μια αζο-ομάδα όπως η ένωση AAPH χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της λιπιδικής υπεροξείδωσης *in vitro* καθώς οι ρίζες ROO• προσομοιάζουν τις ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και ξεκινούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Niki, 1990). Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό και η χημεία τους ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται. Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO• να ξεκινούν τη λιπιδική υπεροξείδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένη, σε ανοιχτή κυκλική και γραμμική. Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων στη δράση των ριζών ROO• γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση.

$$AAPH \xrightarrow{37^{o}C} 2R^{\bullet} + N_2$$

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$



Εικόνα 28: Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 μL. Στον μίγμα της αντίδρασης περιέχονται 1 μg (2 μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 2,5 mM AAPH (4 μL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους 45 min στους 37 ^{o}C στο σκοτάδι. Το AAPH προστίθεται λίγο πριν την επώαση. Μετά την επώαση η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της

βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Το δείγμα το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μαζί με 2,5 mM AAPH αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφηση του πηκτώματος ανάλυση της φωτογραφίας όμοια με την προηγούμενη μέθοδο. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμαζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών $ROO^{\bullet}$. Ως δείκτης μορίου με ισχυρή ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις ρίζες $ROO^{\bullet}$ χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαΐνη (Kruk et al., 2005).

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεών (1-10 mM) στα 45 min στους 37 ^{o}C. Η συγκέντρωση 2,5 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 60-70% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση. Η μεθανόλη σε συγκεντρώσεις ≥0,1% έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις ρίζες $ROO^{\bullet}$ ενώ το DMSO δεν αλληλεπιδρά με τις ρίζες σε συγκεντρώσεις ≤9%. Έτσι τα δείγματα που ήταν διαλυμένα σε αυτούς τους διαλύτες και οι τελικές τους συγκεντρώσεις υπερβαίνουν τα παραπάνω όρια δεν δοκιμάστηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο λόγο ψευδών θετικών αποτελεσμάτων που οφείλονται στο διαλύτη και όχι στο δείγμα.

5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από τις ρίζες $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ εκφράζεται ως το ποσοστό της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το

ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. Το ποσοστό αναστολής της δράσης των ριζών υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_\theta - S_\delta)/(S_\theta - S_0)]x100$$

S_θ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του θετικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ρίζες $OH^\bullet$ ή $ROO^\bullet$).

S_δ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του δείγματος (πλασμιδιακό DNA, ρίζες $OH^\bullet$ ή $ROO^\bullet$ και δείγμα [φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση]).

S_0: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του αρνητικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA μόνο του).

Για την σύγκριση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης των δειγμάτων υπολογίστηκε η τιμή IC_{50}. Η τιμή IC_{50} αποτελεί τη συγκέντρωση του δείγματος που οδηγεί σε 50% αναστολή της δράσης των ριζών $OH^\bullet$ ή $ROO^\bullet$ (αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του δείγματος απέναντι στις ρίζες $OH^\bullet$ ή $ROO^\bullet$.

6. Μελέτη της επίδρασης στη δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα

Αντιδραστήρια

Το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης (XO) από γάλα μόσχου βοοειδών και η πυρογαλλόλη αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA) ενώ το H_2O_2 της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany). Ως πηγή της καταλάσης (CAT) και της ολικής υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

6.1. Μελέτη της ενζυμικής δραστικότητας και της ανασταλτικής/επαγωγικής δράσης παραγόντων

Η επαγωγική ή ανασταλτική επίδραση των δειγμάτων (φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων, καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων) στη δραστικότητα των ενζύμων πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση των υποστρωμάτων που τα ένζυμα βρίσκονται σε κορεσμό, δηλαδή αρχίζουν να δρουν με τη μέγιστη ταχύτητα [V_{max}]. Η V_{max} εκφράζει την

ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης όταν τα ένζυμα βρίσκονται σε κορεσμό, η δράση τους είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων τους και δρουν με σταθερή ταχύτητα.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων στην οποία τα ένζυμα αρχίζουν να δρουν με την μέγιστη ταχύτητα πραγματοποιήθηκε καμπύλη ταχύτητας [V] και συγκέντρωσης υποστρώματος [S]. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις ακολουθούσαν το πρότυπο Michaelis-Menten. Η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης/λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι των αντιδράσεων στα πρώτα 2 με 4 min ανάλογα με το ένζυμο.

Στην περίπτωση ανασταλτικής δράσης ενός δείγματος (π.χ. καθαρή πολυφαινολική ένωση) για τον χαρακτηρισμό του τύπου της αναστολής προσδιορίστηκαν οι τιμές της μέγιστης ταχύτητας [V_{max}] και οι κινητικές σταθερές K_m, και $K_{i,}$. Η K_m αποτελεί τη σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα και ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι η μισή της μέγιστης. Έχει μεγάλη φυσική σημασία καθώς είναι το μέτρο συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της, τόσο πιο μεγάλη είναι η συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα ή αλλιώς τόσο μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για τον κορεσμό του ενζύμου. Η K_i αποτελεί τη σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας και ισούται με τη συγκέντρωση του αναστολέα όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι η μισή της μέγιστης. Αποτελεί το αντίστροφο της K_m και είναι μέτρο συγγένειας του ενζύμου με τον αναστολέα. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της, τόσο πιο μεγάλη είναι η συγγένεια του ενζύμου με τον αναστολέα ή αλλιώς τόσο μικρότερη συγκέντρωση αναστολέα απαιτείται για την αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας.

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις με 3 ή 4 διαφορετικές ισχυρές συγκεντρώσεις αναστολέα σε 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Τα δεδομένα (ταχύτητα του ενζύμου/συγκέντρωση του υποστρώματος) αναλύθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής GraFit 6 (Erithacus Software, Ltd., Horley, UK). Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων για την κινητική μελέτη, επιλέχθηκαν με βάση την συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας κατά 50% (IC_{50}).

Ακόμη επειδή πολλές πολυφαινόλες έχουν την ιδιότητα να απορροφούν στα nm στα οποία εξετάστηκε η δραστικότητα των ενζύμων, πολλά εκχυλίσματα πλούσια σε αυτές επηρέαζαν την οπτική απορρόφηση σε κάποιες συγκεντρώσεις στις οποίες δεν δοκιμάστηκε η δράση τους. Ωστόσο, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων δεν επηρέαζε την οπτική απορρόφηση στα εξεταζόμενα μήκη κύματος.

6.2. Μελέτη της επίδρασης στη δραστικότητα της ΧΟ

Η ΧΟ καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Olson et al., 1974). Η δραστικότητα της ΧΟ προσδιορίζεται μέσω της παραγωγής του ουρικού οξέος με βάση τη μέθοδο των Veskoukis et al. (Veskoukis et al., 2006; Prajda & Weber, 1975). Η μεταβολή στον ρυθμό παραγωγής του ουρικού οξέος παρουσία της ξανθίνη και ενός προς μελέτη δείγματος (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) επιτρέπει τη δυνατότητα παρατήρησης της δράσης επαγωγέων ή αναστολέων στην δραστικότητα της ΧΟ.

Για την παρατήρηση της επίδρασης στην δραστικότητα της ΧΟ η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 500 μL, στον οποίο περιέχονται 323 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου 33 mM και 0,1 mM EDTA (pH 7,5), 80 μL διαλύματος ξανθίνης (4,8 μM) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα (80 μL) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο την ξανθίνη στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 43 munit ενζύμου (nmol ουρικού οξέος/min) (17 μL) και ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής οπτικής απορρόφησης στα 295 nm για 4 min. Η συγκέντρωση 4,8 μM της ξανθίνης επιλέχθηκε ως η συγκέντρωση υποστρώματος που η ΧΟ αρχίζει να δρα με τη μέγιστη ταχύτητα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται από την αύξηση της αρχικής οπτικής απορρόφησης (παραγωγή του ουρικού οξέος) που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη της ΧΟ. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν. Η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ανασταλτικής δράσης καθώς είναι ο πιο γνωστός αναστολέας της ΧΟ, αποτελώντας δομικό ισομερές της ξανθίνης (Pacher et al., 2006; Kelley & Beardmore, 1970). Ακόμη, οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO (≤5%) δεν επηρεάζουν την ενζυμική δραστικότητα της ΧΟ.

6.3. Προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

Ανθρώπινο ολικό αίμα συλλέγεται σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυγοκεντρείται για 10 min στα 1370 g, στους 4°C. Το πλάσμα απομακρύνεται και ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων που βρίσκονται στο ίζημα με προσθήκη 1:1 (v/v) απιονισμένου νερού. Τα ερυθροκύτταρα ανακινούνται βίαια και φυγοκεντρούνται για 15 min στα 4020 g, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Red blood cell lysate, RBCL). Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL). Από 10 mL ολικού αίματος απομονώνονται περίπου 4-5 mL ερυθροκυτταρικού αιμολύματος.

6.4. Μελέτη της επίδρασης στη δραστικότητα της CAT

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της CAT έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984). Η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η μεταβολή στον ρυθμό διάσπασης του H_2O_2 παρουσία καταλάσης και ενός δείγματος (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) επιτρέπει την παρατήρηση της δράσης επαγωγέων ή αναστολέων στην δραστικότητα της CAT.

Για την παρατήρηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της καταλάσης η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 3 mL. Στον όγκο αυτό, περιέχονται 2886 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου 67 mM (pH 7,4), 4 μL ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (αραιωμένο 1:40 v/v) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα (100 μL) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 10 min στους 37°C. Στην συνέχεια 10 μL από διάλυμα H_2O_2 30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτική απορρόφηση στα 240 nm για 2 min. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται από την μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2. Η συγκέντρωση 30 mM του H_2O_2 επιλέχθηκε ως η συγκέντρωση υποστρώματος που η CAT αρχίζει να δρα με τη μέγιστη ταχύτητα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν. Το αζίδιο του νατρίου χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ανασταλτικής δράσης καθώς είναι γνωστός αναστολέας της καταλάσης (Keilin & Hartree, 1934). Ακόμη, οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO (≤5%) δεν επηρεάζουν την ενζυμική δραστικότητα της καταλάσης.

6.5. Μελέτη της επίδρασης στη δραστικότητα της SOD

Η SOD καταλύει τη μετατροπή των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 και O_2. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD έγινε με βάση την μέθοδο του Dieterich et al. (2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης από ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος $O_2^{\bullet-}$ που βρίσκονται στον αέρα. Η πυρογαλλόλη, $C_6H_3(OH)_3$, είναι μια τριυδροξυφαινόλη η οποία όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$ (Gao et al., 1998). Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD βασίζεται στην αναστολή της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης λόγω μετατροπής των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 από την SOD. Η μεταβολή του ρυθμού αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία της SOD και ενός δείγματος (π.χ. φυτικό

εκχύλισμα) επιπρέπει την παρατήρηση της δράσης επαγωγέων ή αναστολέων στην δραστικότητα της SOD.

Για την παρατήρηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της SOD η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL. Στον όγκο αυτό, περιέχονται 770 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 0,05 mM και DTPA 1 mM (pH 8,2), 30 μL ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (αραιωμένο 1:10 v/v) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα (100 μL) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη 100 μL διαλύματος πυρογαλλόλης (0,8 mM) στα δείγματα και ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης 420 nm για 3 min. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται από την μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη της πυρογαλλόλης. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η συγκέντρωση 0,8 mM της πυρογαλλόλης επιλέχθηκε ως η συγκέντρωση που η SOD αναστέλλει την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης με τη μέγιστη ταχύτητα.

Επειδή βιοδραστικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων, όπως είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $O_2^{\bullet -}$ (Cos et al., 1998) δοκιμάζεται και η επίδραση των εκχυλισμάτων στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στον οποίο περιέχονται 800 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 0,05 mM και DTPA 1 mM (pH 8,2) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα (100 μL) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη 100 μL διαλύματος πυρογαλλόλης (0,8 mM) στα δείγματα και ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης 420 nm για 3 min. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Η επίδραση στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης φαίνεται με την μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα σε σύγκριση με την μεταβολή του αρνητικού μάρτυρα που αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα και την πυρογαλλόλη. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Ακόμη, οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO (≤5%) δεν επηρεάζουν την ενζυμική δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

6.6. Ποσοτικός προσδιορισμός της επίδρασης στην ενζυμική δραστικότητα της XO, CAT και SOD

Για κάθε ένζυμο πραγματοποιήθηκε καμπύλη ταχύτητας [V] και συγκέντρωσης υποστρώματος [S] για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων στις οποίες τα ένζυμα καταλύουν τις αντιδράσεις με τη μέγιστη ταχύτητα.

Η ταχύτητα δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του προϊόντος, του ουρικού οξέος (ε_{295}=9600 $M^{-1}cm^{-1}$) στα 295 nm. Η ταχύτητα της οξειδάσης της ξανθίνης εκφράζεται σε μmol ουρικού οξέος που παράγονται από τη δράση του ενζύμου ανά min και υπολογίστηκε με το παρακάτω τύπο:

V (μmol ουρικού οξέος/min) = [(Δabs/min x 500)/9600]

Δabs/min: Ρυθμός μεταβολής της οπτικής απορρόφησης ανά min.

Η ταχύτητα δράσης της καταλάσης υπολογίστε με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του υποστρώματος, του H_2O_2 (ε_{240}= 40 $M^{-1}cm^{-1}$) στα 240 nm. Η ταχύτητα της καταλάσης εκφράζεται σε mmol H_2O_2 που διασπώνται από τη δράση του ενζύμου ανά min και υπολογίστηκε με το παρακάτω τύπο:

V (mmol H_2O_2/min) = [(Δabs/min x 3)/40]

Η ταχύτητα δράσης της SOD υπολογίστε με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας της πυρογαλλόλης (ε_{420}= 2,47 $mM^{-1}cm^{-1}$) στα 420 nm. Η ταχύτητα της SOD εκφράζεται σε mmol πυρογαλλόλης που αυτοοξειδώνονται παρουσία του ενζύμου ανά min και υπολογίστηκε με το παρακάτω τύπο:

V (mmol πυρογαλλόλης/min) = [(Δabs/min x 1)/2470]

Για κάθε δείγμα (π.χ. φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα ή καθαρή ένωση) προσδιοριζόταν οι τιμές IC_{50} και PC_{50} στις συγκεντρώσεις υποστρωμάτων των ενζύμων στις οποίες τα ένζυμα βρίσκονται σε κορεσμό. Η τιμή IC_{50} αποτελεί τη συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας κατά 50% ενώ η τιμή PC_{50} αποτελεί τη συγκέντρωση του επαγωγέα που προκαλεί επαγωγή της ενζυμικής δραστικότητας κατά 50% σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι τιμές IC_{50} και PC_{50} είναι ενδεικτικές της ισχύος των αναστολέα και επαγωγέων αντίστοιχα επιτρέποντας τη σύγκριση μεταξύ τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} ή PC_{50} πιο ισχυρή είναι η ανασταλτική ή η επαγωγική δράση του δείγματος στη δραστικότητα των ενζύμων.

7. Εκτίμηση της επίδρασης στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση Ι να προκαλεί μονόκλωνα θραύσματα στο DNA

7.1. Πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ευκαρυωτική τοποϊσομεράση τύπου Ι σε πλασμιδιακό DNA

Η DNA τοποϊσομεράση Ι (Topo I) δρα σχηματίζοντας παροδικά μονόκλωνα θραύσματα μέσα από τα οποία περνούν άλλες DNA αλυσίδες και επιτυγχάνεται η χαλάρωση των υπερελικώσεων του DNA (Εικόνα 21) (Wang, 1996). Η παρατήρηση της δράσης της Topo I και της επίδρασης παραγόντων σε αυτή, γίνεται μέσω αλλαγής των διαμορφώσεων πλασμιδιακού DNA όπως εμφανίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση. Η Topo I προκαλώντας μονόκλωνα θραύσματα αλλάζει την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική. Η παρεμπόδιση της αλλαγής της διαμόρφωσης υποδεικνύει κάποια εμπλοκή στην καταλυτική δράση του ενζύμου να προκαλεί μονόκλωνα θραύσματα. Παράγοντες οι οποίοι επάγουν την μετάβαση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική και γραμμική διαμόρφωση από την τοποϊσομεράση Ι, δείχνουν έναν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με το ένζυμο.

Για την παρατήρηση της δράσης των δειγμάτων, φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε ένζυμο της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης Ι από σπέρμα σιταριού το οποίο ήταν της εταιρίας Promega (Madison, USA). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 20 μL. Στο μίγμα της αντίδρασης περιέχονται 1 μg (2 μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 20% γλυκερόλη, DTT 1 mM, 1,3 units ενζύμου Topo I και το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις (3 μL). Για κάθε πείραμα, το δείγμα το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο μαζί με το ένζυμο αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου και επωάζονται για 15 min στους 37°C. Τα 1,3 units είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την μετατροπή κατά 90% της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του 1 μg πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση στις παραπάνω συνθήκες. Μετά την επώαση των δειγμάτων η αντίδραση

τερματίζεται με την προσθήκη 5 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min.

Ακολουθεί φωτογράφηση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα, για τον προσδιορισμό της % επίδρασης στη δράση της τοποϊσομεράσης I στο DNA. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμαζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO, δεν επηρεάζουν τη δραστικότητα της τοποϊσομεράσης I. Ως δείκτης μορίου με ισχυρή ανασταλτική δράση στην τοποϊσομεράση I χρησιμοποιήθηκε ένα υδατικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού (*Vitis vinifera*) ποικιλίας Μανδηλαριάς. Το εκχύλισμα αυτό σε συγκέντρωση 200 μg/mL, αναστέλλει κατά 89% την δράση της τοποϊσομεράσης I να αλλάζει την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική (Stagos et al., 2005).

7.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της επίδρασης στη δράση της τοποϊσομεράσης I

Η δράση της τοποϊσομεράσης I εκφράζεται ως το ποσοστό της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων ως αναστολέων της καταλυτικής δράσης του ενζύμου εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία της Topo I σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Παράγοντες οι οποίοι επάγουν την μετάβαση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική και γραμμική διαμόρφωση από την τοποϊσομεράση I, δείχνουν έναν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με το ένζυμο. Το ποσοστό αναστολής/επαγωγής της δράσης της Topo I υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή/επαγωγή της Topo I} = [(S_\theta - S_\delta)/(S_\theta - S_0)]x100$$

S_θ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του θετικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και 1,3 units Topo I).

S_δ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του δείγματος (πλασμιδιακό DNA, 1,3 units Topo I και δείγμα [φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση]).

S_0: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του αρνητικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA μόνο του).

8. Εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μέσω αναστολής επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε βακτηριακά κύτταρα *Salmomella typhimurium*

Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό Nutrient Broth, το άγαρ και η μπλεομυκίνη αποκτήθηκαν από τις εταιρίες Merck (Darmstadt, Germany), Pancreac (Spain) και Nippon Kayaku (Japan) αντίστοιχα. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck, Pancreac και Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA). Υγρή καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους *Salmonella typhimurium* TA102 διατηρούνταν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C.

8.1. Εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης με τη δοκιμασία του Ames

Η δοκιμασία του Ames (Ames mutagenicity test) είναι μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την παρατήρηση της μεταλλαξιγόνου, καρκινογόνου δράσης εξωγενών παραγόντων (Ames et al., 1975). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* τα οποία φέρουν μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Τα στελέχη αυτά (His^-) λόγω των μεταλλάξεων, δεν έχουν την ικανότητα να κωδικοποιήσουν ένα από τα ένζυμα που χρειάζεται για τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο απουσία του συγκεκριμένου αμινοξέος (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Τα πιο συνηθισμένα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι τα TA98, TA100, TA102, TA1535 και TA1538. Όταν τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης τότε είναι πιθανό να συμβούν επαναμεταλλάξεις, δηλαδή νέες μεταλλάξεις στα ήδη μεταλλαγμένα γονίδια της ιστιδίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί επαναμεταλλάξεις (His^+) μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Ο

αριθμός των αυθόρμητων επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *Salmonella typhimurium*. Ωστόσο, η έκθεση της καλλιέργειας σε έναν μεταλλαξιγόνο παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών νέων μεταλλάξεων, είτε στη θέση των προϋπαρχουσών μεταλλάξεων, είτε σε γειτονικά γονίδια. Ορισμένες από αυτές αναστρέφουν την αρχική μετάλλαξη, οδηγώντας στην επανάκτηση της ικανότητας των βακτηρίων να συνθέτουν ιστιδίνη και συνεπώς να σχηματίζουν αποικίες απουσία του αμινοξέος, ο αριθμός των οποίων ανά τριβλίο αυξάνεται συνήθως με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Η ιδιότητα αυτών των βακτηριακών στελεχών να μην μπορούν να αναπτυχθούν απουσία ιστιδίνης χρησιμοποιείται και για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εξωγενών παραγόντων (π.χ. φυτικό εκχύλισμα). Σε αυτή την περίπτωση, στις βακτηριακές καλλιέργειες επάγονται μεταλλάξεις μέσω ενός γνωστού μεταλλαξιγόνου παράγοντα και παρατηρείται η αναστολή της επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης από την εξεταζόμενη ουσία (Grey & Aldecreutz, 2003; Mortelmans & Zeiger, 2000). Για την παρούσα μελέτη η μέθοδος του Ames, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων με τη χρήση της μπλεομυκίνης ως μεταλλαξιγόνου παράγοντα.

8.1.1. Ιδιότητες του στελέχους Salmonella typhimurium *TA102*

Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102. Το στέλεχος TA102 είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες (Levin et al., 1982). Φέρει τη μετάλλαξη *hisG428* στο οπερόνιο της ιστιδίνης στο πλασμίδιο pAQ1 που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102. Η μετάλλαξη *hisG428* είναι μία μετάλλαξη λήξης (TAA) η οποία μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (μεταπτώσεις ή μεταστροφές). Όλα τα στελέχη *Salmonella typhimurium*, έτσι και το στέλεχος TA102 φέρει χαρακτηριστικά που το καθιστούν πιο ευαίσθητο στη δράση χημικών μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Ακόμη, περιέχει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και UV-ακτινοβολία μεταλλάξεις μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway). Τα πλασμίδια pAQ1 και pKM101 προσδίδουν στο στέλεχος ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνη

και αμπικιλλίνη αντίστοιχα τα οποία χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ανίχνευση του. Ο αριθμός των αυθόρμητων His^+ αποικιών του στελέχους TA102 κυμαίνονται από 200-300 (Levin et al. 1982; Mortelmans & Zeiger, 2000).

8.1.2. Μηχανισμός δράσης της μπλεομυκίνης

Τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω καθιστούν το στέλεχος TA102 κατάλληλο για την μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης (Bleomycin). Οι μπλεομυκίνες αποτελούν μία οικογένεια σύνθετων αντιβιοτικών γλυκοπεπτιδίων που απομονώνονται από καλλιέργειες του *Streptomyces verticillus* και αποτελούν αντικαρνικινά φάρμακα. Έχουν την ικανότητα να επάγουν μεταλλάξεις στο DNA και χρησιμοποιείται και στην θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (Dorr, 1992; Thurston, 2007). Η μπλεομυκίνη A_2 είναι η κυριότερη μπλεομυκίνη που χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας. Ο κύριος λόγος που επιλέχθηκε η μπλεομυκίνη A_2 ως μεταλλαξιγόνος παράγοντας είναι γιατί στον μηχανισμό επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες (Εικόνα 29). Ο κυτταρικός μηχανισμός δράσης της οφείλεται στην ικανότητα της μπλεομυκίνης να δεσμεύεται με το DNA και να προκαλεί μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα στο DNA παρουσία Fe^{2+}, O_2 και ενός αναγωγικού παράγοντα, που δρα ως συμπαράγοντας (Hecht, 2000; Burger, 1998).

Όλα τα δραστικά παράγωγα της μπλεομυκίνης συνδέονται με ιόντα τρισθενούς σιδήρου Fe^{3+}. Παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, το σύμπλοκο ανάγεται (Fe^{2+}) και σχηματίζει ένα νέο σύμπλοκο με μοριακό οξυγόνο. Το σύμπλοκο DNA-BLM-Fe^{2+}-O_2 ενεργοποιείται και παράγει ελεύθερες ρίζες, όπως $O_2^{\bullet -}$ και $OH^{\bullet}$, οι οποίες δημιουργούν ένα σύμπλεγμα με τις έλικες του DNA και προκαλούν σπασίματα στο DNA (Εικόνα 29) (Hecht, 2000; Burger, 1998).

$$\text{DNA} + \text{BLM-Fe}^{3+} \rightarrow \text{DNA-BLM-Fe}^{3+}$$
$$\text{DNA-BLM-Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{DNA-BLM-Fe}^{2+}$$
$$\text{DNA-BLM-Fe}^{2+} + O_2 \rightarrow \text{DNA-BLM-Fe}^{2+}\text{-}O_2$$
$$\text{DNA-BLM-Fe}^{2+}\text{-}O_2 + e^- + H^+ \rightarrow \text{DNA-BLM-Fe}^{3+}\text{-OOH}$$
$$\text{DNA-BLM-Fe}^{3+}\text{-OOH} \rightarrow \text{μεταλλαγμένο DNA} + \text{BLM-Fe}^{3+}$$

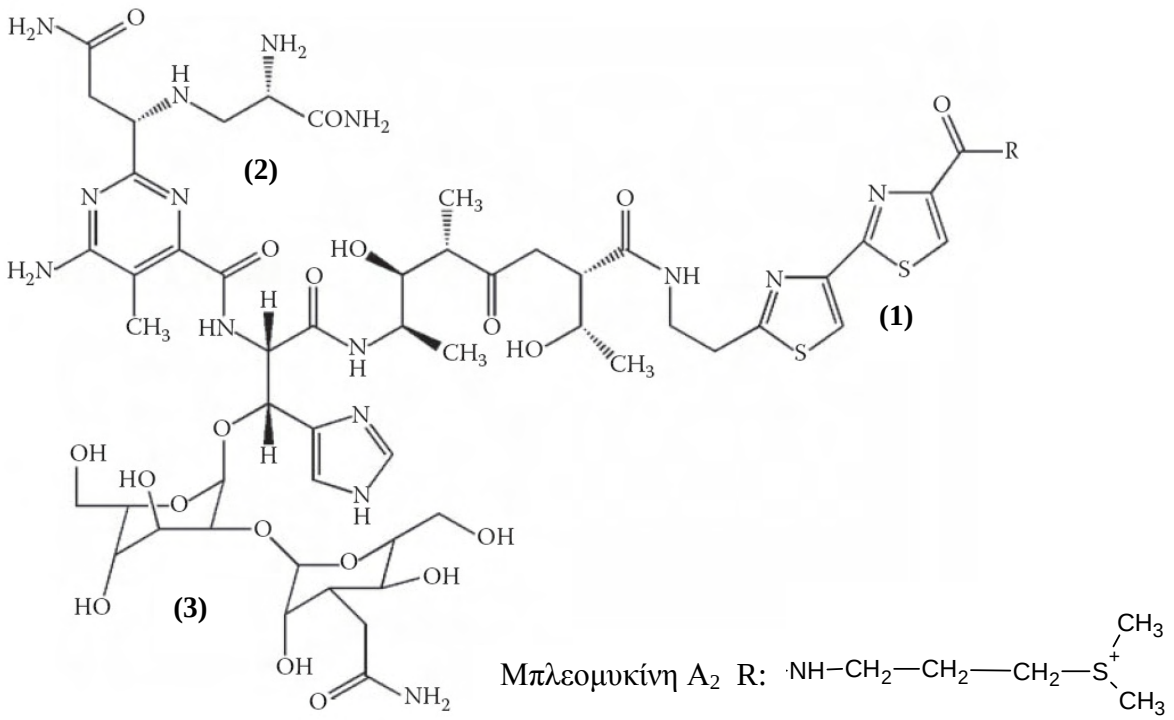
Εικόνα 29: Αντιδράσεις της μπλεομυκίνης (BLM) με τα ιόντα σιδήρου και το DNA, με ταυτόχρονη παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Η μπλεομυκίνη A_2 (Εικόνα 30) διαθέτει τρεις λειτουργικές περιοχές που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης της:

- Η πρώτη περιοχή αποτελεί εκείνη με την οποία θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με το DNA (**1**). Η περιοχή αυτή αποτελείται από μια ετεροκυκλική ομάδα διθειαζόλης. Το ιδιαίτερα δραστικό ιόν - NH(CH2)3S+Me2 (R) αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες του DNA και σταθεροποιεί το σύμπλοκο της μπλεομυκίνης με το DNA.

- Η δεύτερη περιοχή αποτελεί τη μεταλλοδεσμευτική περιοχή (**2**). Η περιοχή αυτή αποτελείται από μια β-υδροξυιστιδίνη, μια β-αμινοαλανίνη και μια πυριμιδίνη. Μέσω της περιοχή αυτής συνδέεται με τα ιόντα σιδήρου, δημιουργεί σύμπλοκο με το O_2 παράγοντας ελεύθερες ρίζες και οδηγεί στη δημιουργία των μονόκλωνων ή δίκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

- Η τρίτη περιοχή αποτελεί την περιοχή των σακχάρων (**3**). Η γλυκοπεπτιδική περιοχή είναι η λιγότερο χαρακτηρισμένη περιοχή της μπλεομυκίνης και δεν έχει κάποιο συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης. Ωστόσο, θεωρείται ότι συμβάλει, στην κυτταρική αναγνώριση της μπλεομυκίνης και στο σχηματισμό επιπρόσθετων δεσμών υδρογόνου με το DNA σταθεροποιώντας το σύμπλοκο που σχηματίζεται (Thurston, 2007; Burger, 1998).



Εικόνα 30: Χημική δομή της μπλεομυκίνης A_2.

8.1.3. Μέθοδος εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δειγμάτων

Για την μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης η διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία των τριβλίων Glucose Minimal άγαρ (GM, στερεό θρεπτικό υπόστρωμα), την επιμόλυνση του υγρού θρεπτικού υλικού Nutrient broth με βακτήρια (από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων που βρίσκεται στους -80°C), την προετοιμασία του top άγαρ (υγρό θρεπτικό μέσο) και την προσθήκη σε αυτό της βακτηριακής καλλιέργειας, του μεταλλαξιγόνου παράγοντα (μπλεομυκίνη) και των υπό εξέταση δειγμάτων (φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα ή καθαρή ένωση). Ακολουθεί επίστρωση του top άγαρ πάνω στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, επώαση των τριβλίων στους 37°C για 48 h και καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων His^{+} αποικιών/τριβλίο. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιούνται σε όσο το δυνατόν ασυπτικές συνθήκες.

Αρχικά προετοιμάζεται το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα GM άγαρ το περιέχει διάλυμα αλάτων Vogel–Bonner (VB) και διάλυμα γλυκόζης. Για την παρασκευή 1000 mL θρεπτικού GM άγαρ σε 900 mL H_2O προστίθενται 15 g άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 120°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 45 min και ακολουθεί προσθήκη 20 mL διαλύματος VB 50x και 50 mL διαλύματος γλυκόζης 10% v/v. Για την παρασκευή 20 mL διαλύματος αλάτων VB, σε 13 mL H_2O, διαλύονται 0,2 gr $MgSO_4$, 2 gr κιτρικό οξύ, 10 gr K_2HPO_4 και 3,5 gr $Na_2NH_2PO_4$ $4H_2O$. Τα διαλύματα VB και γλυκόζης που χρησιμοποιούνται έχουν αποστειρωθεί για 20 min στους 120°C. Το θρεπτικό GM άγαρ μοιράζεται (25 mL/τριβλιό) σε τριβλία (100x15 mm) και αφήνεται να πήξει.

Ακολουθεί η προετοιμασία των υγρών θρεπτικών υλικών Nutrient broth και top άγαρ. Για το πρώτο θρεπτικό υλικό 2,4 gr Nutrient broth διαλύονται σε 30 mL H_2O. Για το top άγαρ 0,36 gr άγαρ, 0,36 gr NaCl και 6 mL διαλύματος ιστιδίνης 0,5 mM προστίθενται σε 54 mL H_2O. Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται για 20 min στους 120°C. Το διάλυμα της ιστιδίνης προετοιμάζεται ξεχωριστά, αποστειρώνεται και στην συνέχεια προστίθεται στο top άγαρ το οποίο διατηρείται σε ακριβώς 45°C σε υδατόλουτρο.

Για την μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δειγμάτων, αρχικά το θρεπτικό υλικό επιμολύνεται με 200 μL κυττάρων *Salmonella typhimurium* TA102 που διατηρούνται στους -80°C. Τα κύτταρα αναπτύσσονται μέχρι να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης στην οποία φτάνουν όταν η πυκνότητά τους είναι 1-2x10^{9} μονάδες αποικών ανά mL (CFU/mL). Ο έλεγχος της πυκνότητας των κυττάρων γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 nm. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης μεταξύ 0,1-0,2 αντιστοιχούν σε 1-2x10^{9} μονάδες αποικών ανά mL.

Για την πειραματική διαδικασία σε 2 mL top άγαρ το οποίο βρίσκεται στους 45°C προστίθενται τα εξής:

- 100 μL της καλλιέργειας των κυττάρων *Salmonella typhimurium* TA102, 1-2x10^{9} CFU/mL
- 50 μL της μπλεομυκίνης (0,5 μg/τριβλίο τελική συγκέντρωση)
- 50 μL του προς εξέταση δείγματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Η θερμοκρασία του top άγαρ είναι απαραίτητο να διατηρείται στους 45°C γιατί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 48°C τα κύτταρα σκοτώνονται ενώ σε μικρότερη από 43°C πήζει το άγαρ. Τα δείγματα αναδεύονται ήπια και το top άγαρ επιστρώνεται στην επιφάνεια των τριβλίων που περιέχουν το GM άγαρ. Όταν το top άγαρ στερεοποιηθεί (2-3 min), τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 48 h. Μετά την επώαση γίνεται καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων His+ αποικιών που αναπτύσσονται σε κάθε τριβλίο. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για την εξέταση της δράση του κάθε δείγματος.

Τα δείγματα τα οποία περιέχουν μόνο τα κύτταρα TA102 αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα με την μπλεομυκίνη 0,5 μg/τριβλίο αποτελούν το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με τα κύτταρα στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στα κύτταρα TA102. Ως δείκτης ισχυρής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης χρησιμοποιήθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού (*Vitis vinifera*) ποικιλίας Μανδηλαριάς, το οποίο σε συγκέντρωση 6 mg/τριβλίο αναστέλλει την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση κατά 70% (Stagos et al., 2005).

Η συγκέντρωση της μπλεομυκίνης επιλέχθηκε μετά από δοκιμή της μεταλλαξιγόνου δράσης διάφορων συγκεντρώσεών μπλεομυκίνης (0,125, 0,25, 0,5 και 1 μg/τριβλίο) στα κύτταρα. Η συγκέντρωση 0,5 μg/τριβλίο επάγει κατά 70% τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σχέση με το θετικό μάρτυρα χωρίς να είναι τοξική για τα κύτταρα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρέαζαν τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών παρουσία ή απουσία της μπλεομυκίνης.

8.1.4. Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας

Εκτός από τον έλεγχο της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δειγμάτων εξετάστηκε και η πιθανή κυτταροτοξικότητα των προς εξέταση δειγμάτων στα κύτταρα. Η προσθήκη μικρής ποσότητας ιστιδίνης στο top άγαρ επιτρέπει σε όλα τα βακτήρια να εκτελέσουν λίγες κυτταρικές διαιρέσεις. Τα επαναμεταλλαγμένα His^+ βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται στα τριβλία συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται απουσία ιστιδίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό ορατών αποικιών. Εκτός από τις ορατές αποικίες στα τριβλία υπάρχουν και μικροαποικίες (background lawn), που σχηματίζονται από τα εξαρτώμενα από ιστιδίνη κύτταρα, τα οποία λόγω εξάντλησης της παρεχόμενης ιστιδίνης δεν έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν περισσότερες από 6-8 διαιρέσεις. Ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας γίνεται μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης (40x μεγέθυνση) του μη ορατού με γυμνό μάτι στρώματος των μικροαποικιών (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Η σύγκριση της πυκνότητας του στρώματος των μικροαποικιών γίνεται σε σχέση με αυτής του αρνητικού ή του θετικού μάρτυρα, απουσία ή παρουσία μπλεομυκίνης αντίστοιχα. Σε περίπτωση μη τοξικότητας, η πυκνότητα των αποικιών αυτών είναι μεγάλη. Αντίθετα, σε ήπια τοξικότητα παρατηρείται μείωση της πυκνότητας των μικροαποικιών που συνήθως συνοδεύεται και από κάποια μείωση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών, ενώ σε έντονη τοξικότητα τα βακτήρια δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν, με συνέπεια την πλήρη απουσία των μικροαποικιών.

8.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών His^+/τριβλίο. Ο υπολογισμός της % αναστολής της μεταλλαξιγένεσης έγινε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(N_\theta - N_\delta)/(N_\theta - N_0)]x100$$

N_θ: Η μέση τιμή του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών His^+/τριβλίο στο θετικό μάρτυρα (TA102 και μπλεομυκίνη).

N_δ: Η μέση τιμή του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών His^+/τριβλίο παρουσία του δείγματος (TA102, εκχύλισμα ή πολυφαινολικό κλάσμα και μπλεομυκίνη).

N_0: Η μέση τιμή του αριθμού των αυθόρμητων επαναμεταλλαγμένων αποικιών His^+/τριβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

9. Επίδραση εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη και σε συστήματα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2

Υλικά/Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's και ήταν εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη (MEM+Earle's) και ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco/Invitrogen (Paisley, Scotland, UK), ενώ τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), της τρυψίνης-EDTA 0,25%, των αλάτων Hanks και της χρωστικής tryptan blue (0,4%) και το αντιδραστήριο Hepes από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Η κυτταρική σειρά Hep2 ανθρώπινων επιθυλιακών καρκινικών κυττάρων λάρυγγα (human laryngeal epithelial carcinoma, Hep-2) αποκτήθηκε από το εργαστήριο Μικροβιολογίας/Ιολογίας του τμήματος της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στα φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 25-cm^2 της εταιρίας Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgium).

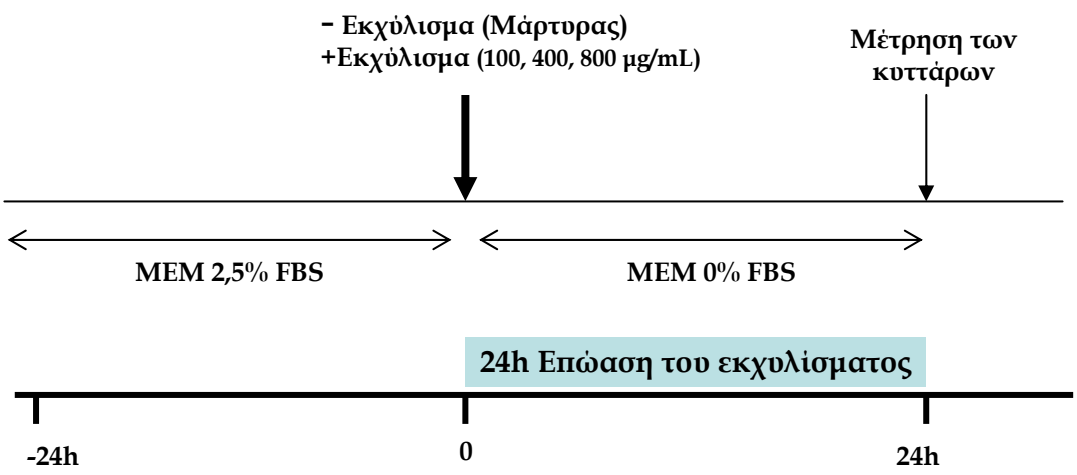
9.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2

Τα κύτταρα Hep2 ανθρώπινων επιθυλιακών καρκινικών κυττάρων λάρυγγα καλλιεργούνται σε 25-cm^2 φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό MEM (6-7 mL) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 1% διάλυμα μίγματος αντιβιοτικών και αντιμυκητιακών, 0,01 M Hepes και ορό FBS σε επωαστικό κλίβανο στους 37^oC. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 2,5 ή 5% ορό FBS μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι πλήρης από κύτταρα. Το ποσοστό ορού FBS καθορίστηκε σε 2,5 ή 5% το οποίο είναι αρκετό ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων στις συνθήκες μελέτης της δράσης των εκχυλισμάτων. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται με αποκόλληση των κυττάρων με διάλυμα 0,1% τρυψίνης/EDTA αραιωμένη σε διάλυμα αλάτων Hanks. Η έκθεση στην τρυψίνη διαρκούσε 1-2 min στους 37^oC και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 2,5 ή 5% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσο το δυνατόν ασυπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

9.2. Μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων Hep2

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 31. Αριθμός $1x10^6$ κύτταρων Hep2 προστίθενται σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό MEM (6-7 mL) εμπλουτισμένο με 2,5% FBS. Στην συνέχεια ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού υλικού και δύο φορές πλύση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό MEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (6,5 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και τα εκχυλίσματα (200 μL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (100, 400 και 800 μg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων για 24 h. Όλες οι δοκιμές των εκχυλισμάτων πραγματοποιούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με τα εκχυλίσματα και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Ακόμη, τα διαλύματα των εκχυλισμάτων πριν από την προσθήκη τους, αποστειρώνονται μετά από πέρασμα, με την βοήθεια σύριγγας, από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm.

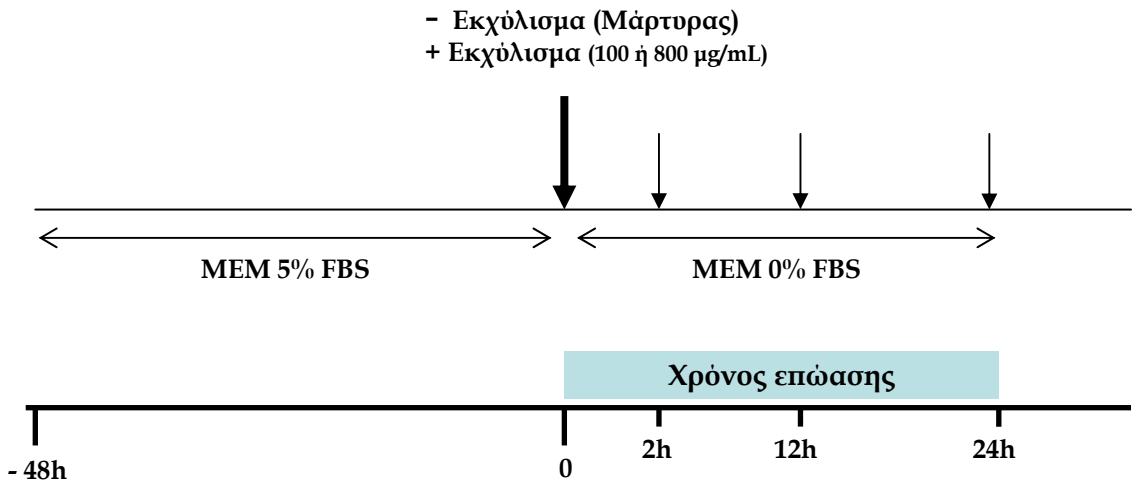
Μετά την επώαση ακολουθεί απομάκρυνση του υλικού και αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας με 0,1% διάλυμα τρυψίνης/EDTA σε διάλυμα αλάτων Hanks τα οποία επαναιωρούνται σε 5 mL θρεπτικού υλικού MEM με 2,5% FBS. Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που παρέμειναν προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας μετά την επώαση με τα εκχυλίσματα, σε σύγκριση με τον αριθμό τους στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα. Τα βιώσιμα κύτταρα μετρούνται σε κυτταρόμετρο τύπου Neubauer (Hausser Scientific, USA) ύστερα από χρώση των κυττάρων με την χρωστική trypan blue (0,1% σε διάλυμα φωσφορικών PBS 0,1 M, pH 7,4). Η δράση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος εξεταζόταν εις τριπλούν σε ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.



Εικόνα 31: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων Hep2. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό MEM εμπλουτισμένο με 2,5% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού στις 24 h σε MEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη μέτρηση των κυττάρων.

9.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2

Ο πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 32. Αριθμός $1,4x10^6$ κύτταρων Hep2 προστίθενται σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας ώστε να επιτευχθεί μεγάλος αριθμός βιώσιμων κυττάρων για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων. Τα κύτταρα επωάζονται για 48 h σε θρεπτικό υλικό MEM (6-7 mL) εμπλουτισμένο με 5% FBS. Μετά από τις 48 h, ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού υλικού και δύο φορές πλύση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό MEM απουσία ορού FBS. Σε αυτή τη χρονική στιγμή γίνεται η προσθήκη των εκχυλισμάτων (200 μL) στις φλάσκες στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (100 ή 800 μg/mL). Στις φλάσκες που αποτελούσαν τους μάρτυρες προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (6,5 mL). Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα τις επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που επιλέχθηκαν δεν ήταν κυτταροτοξικές και τα διαλύματα των εκχυλισμάτων πριν από την προσθήκη τους, αποστειρώνονται μετά από πέρασμα με την βοήθεια σύριγγας, από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm.



Εικόνα 32: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2. Τα κύτταρα επωάζονται για 48 h σε θρεπτικό υλικό MEM εμπλουτισμένο με 5% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε MEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη των εκχυλισμάτων και αποτελεί το σημείο 0. Τα κύτταρα επωάζονται για 2, 12 και 24 h με τα εκχυλίσματα. Τα λεπτά βέλη συμβολίζουν τις χρονικές στιγμές της επώασης και συλλογής των κυττάρων για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Για κάθε χρονική επώαση υπήρχε ο αντίστοιχος αρνητικός μάρτυρας.

Τα κύτταρα επωάστηκαν για 2, 12 και 24 h με τα εκχυλίσματα σε θρεπτικό υλικό με 0% σε ορό FBS. Για κάθε χρόνο επώασης οι φλάσκες που περιείχαν μόνο κύτταρα σε θρεπτικό υλικό MEM απουσία ορού FBS αποτελούσαν τους μάρτυρες. Κάθε χρονική επώαση είχε τους δικούς της μάρτυρες. Οι χρόνοι επώασης των κυττάρων με τα εκχυλίσματα επιλέχθηκαν ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους σε μικρό (2 h) και σε μεγάλο χρονικό διάστημα (12 και 24 h). Κάθε χρονική επώαση των κυττάρων με το προς εξέταση εκχύλισμα έγινε εις τριπλούν και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

Μετά την ολοκλήρωση των επωάσεων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές (2, 12 και 24 h), ακολουθεί απομάκρυνση του υλικού και αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας με 0,1% διάλυμα τρυψίνης/EDTA σε διάλυμα αλάτων Hanks τα οποία επαναιωρούνται σε 3 mL θρεπτικού υλικού MEM με 1% FBS. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) το οποίο είναι σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται μετά από επίδραση σε

υπερήχους για 1 min με περιοδικές διακοπές των 10 sec. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 15 min στους 4°C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Στην συνέχεια αμέσως μετά, ακολούθησε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.

Για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων, στο κυτταροπλασματικό αιώρημα που απομονώθηκε με την παραπάνω διαδικασία προσδιορίστηκαν διάφοροι δείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες. Πιο αναλυτικά προσδιορίστηκαν η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων (total antioxidant capacity, TAC), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) και οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης.

Ακόμη ως δείκτης υπεροξείδωσης των λιπιδίων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric reactive substances, TBARS). Ο προσδιορισμός του παραπάνω δείκτη πραγματοποιήθηκε σε αιώρημα των κυττάρων χωρίς σε αυτά να έχει προηγηθεί επίδραση σε αυτά με υπερήχους. Πιο αναλυτικά μετά την συλλογή και την πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4), όπως περιγράφηκε παραπάνω, τα κύτταρα απλά επαναιωρούνται σε 1,5 mL PBS (0,01 M με pH 7,4). Το κυτταρικό αυτό αιώρημα, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford και το προσδιορισμό των TBARS. Όμοια τα δείγματα αυτά αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.

9.4. Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων

Η κυτταροτοξικότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό μείωσης του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων που παραμένουν στην επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το ποσοστό μείωσης του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ κυτταροτοξικότητα} = [(N^{o}_{0} - N^{o}_{\delta})/ N^{o}_{0}]x100$$

N^{o}_{0}: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα (μόνο Hep2).

N^{o}_{δ}: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του δείγματος (Hep2 και εκχύλισμα).

9.5. Προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2

Η εκτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω δεικτών εκτίμησης οξειδωτικού στρες. Πιο αναλυτικά προσδιορίστηκε η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των κυττάρων, η δραστικότητα της CAT και οι συγκεντρώσεις της GSH και της GSSG. Ακόμη ως δείκτης υπεροξείδωσης των λιπιδίων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι δείκτες προσδιορίστηκαν και στις τρεις χρονικές επωάσεις (2, 12 και 24 h) των κυττάρων με τα εκχυλίσματα. Για κάθε χρονική επώαση υπήρχαν και οι αντίστοιχοι αρνητικοί μάρτυρες. Η σύγκριση των τιμών των δεικτών υπολογίστηκε με το παρακάτω τύπο.

$$\% \text{ διαφορά} = [(A_0 - A_\delta)/A_0]$$

A_0: Μέση τιμή του δείκτη του κάθε φορά αρνητικού μάρτυρα κάθε χρονικής επώασης.

A_δ: Μέση τιμή του δείκτη του δείγματος (συγκέντρωση εκχυλίσματος) κάθε χρονικής επώασης.

10. Επίδραση εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας φυσιολογικών ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος

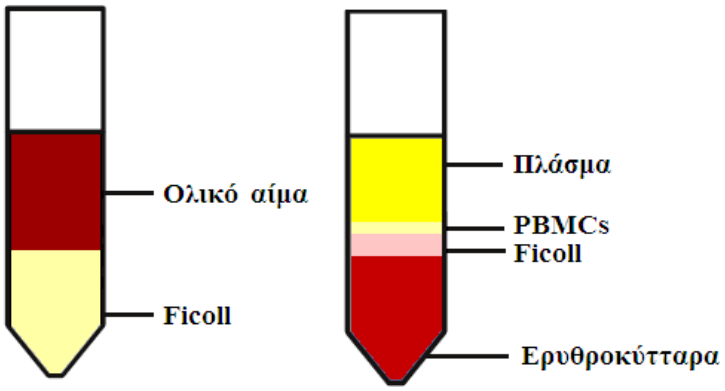
Υλικά/Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των ανθρώπινων μονοκυττάρων RPMI-1640 ήταν εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS) και το διάλυμα φωσφορικών PBS (1x) pH 7,4 αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco/Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Το διάλυμα Ficoll τύπου 400 (90% H_2O), των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), του tert-Butyl hydroperoxide (70% w/v) (t-BOOH), της χρωστικής trypan blue (0,4%) και το διάλυμα φωσφορικών PBS 0,01 M αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

10.1. Απομόνωση και καλλιέργεια των ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος

Τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) απομονώνονται από ολικό περιφερικό αίμα που συλλέγεται σε ηπαρινισμένη σύριγγα. Απομονώνονται με τη χρήση του διαχωριστικού μέσου Ficoll, προσθέτοντας ίση ποσότητα αίματος με αυτή του Ficoll. Πιο αναλυτικά 10 mL ηπαρινισμένου αίματος προστίθενται προσεκτικά πάνω σε 10 mL Ficoll. Στη συνέχεια το αίμα φυγοκεντρείται στα 400 g για 20

min στους 20°C. Η φυγοκέντρηση γίνεται χωρίς φρένο και χωρίς επιτάχυνση για να γίνει ο διαχωρισμός των μονοκυττάρων χωρίς να υπάρχει ανάμιξη με το Ficoll το οποίο είναι κυτταροτοξικό για τα κύτταρα του αίματος. Το ημίλευκο στρώμα ανάμεσα στο πλάσμα και το στρώμα των ερυθροκυττάρων και του Ficoll αποτελεί το στρώμα των μονοκυττάρων του αίματος (λεμφοκύτταρα, μονοπύρηνα, θρομβοκύτταρα) (Εικόνα 33). Το στρώμα των κυττάρων συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και προστίθεται σε 10 mL θρεπτικού μέσου RPMI-1640. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση στα 400 g για 20 min στους 20°C σε κανονικό φρένο και επιτάχυνση. Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 20 mL θρεπτικού μέσου RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 h σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού του στρώματος των PBMCs μετά την φυγοκέντρηση ολικού περιφερικού αίματος με το Ficoll.

10.2. Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στα PBMCs

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στα PBMCs, τα κύτταρα μετά την απομόνωση και την 24-ωρη επώασή τους σε 20 mL θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS στους 37°C, μετρούνται με την χρήση κυτταρόμετρου τύπου Neubauer (Hausser Scientific, USA). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα τοποθετούνται σε 24-θέσεων πλάκες ανάπτυξης κυττάρων της εταιρίας Corning (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Αριθμός 2x10^{6} κυττάρων PBMCs (2 mL) προστίθενται στις θέσεις της 24-θέσεων πλάκας σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα

αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 0% ορό FBS. Στην συνέχεια προστίθενται τα εκχυλίσματα (20 μL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (2, 5, 10, 50, 100, 200, 400 και 800 μg/mL) και τα κύτταρα επωάζονται για 4 h. Στα δείγματα που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο το θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Όλες οι δοκιμές των εκχυλισμάτων πραγματοποιούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με τα εκχυλίσματα και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Ακόμη, τα διαλύματα των εκχυλισμάτων πριν από την προσθήκη τους, αποστειρώνονται μετά από πέρασμα με την βοήθεια σύριγγας από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων που έχουν μείνει στην πλάκα, σε κυτταρόμετρο τύπου Neubauer ύστερα από χρώση των κυττάρων με την χρωστική trypan blue (0,1% σε διάλυμα φωσφορικών PBS 0,1 M, pH 7,4). Ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικής επίδρασης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων, μετά την επώαση με τα εκχυλίσματα σε σύγκριση με τον αριθμό τους στις θέσεις της πλάκας που αποτελούσαν το μάρτυρα. Η δράση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος εξεταζόταν εις τριπλούν σε τουλάχιστον δύο πειραματικές διαδικασίες.

10.3. Ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων

Η κυτταροτοξικότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό μείωσης του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων που παραμένουν μετά την επώαση με τα εκχυλίσματα σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το ποσοστό μείωσης του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ κυτταροτοξικότητα} = [(N^o_0 - N^o_\delta)/ N^o_0]x100$$

N^o_0: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα (μόνο PBMCs).

N^o_δ: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του δείγματος (PBMCs και εκχύλισμα).

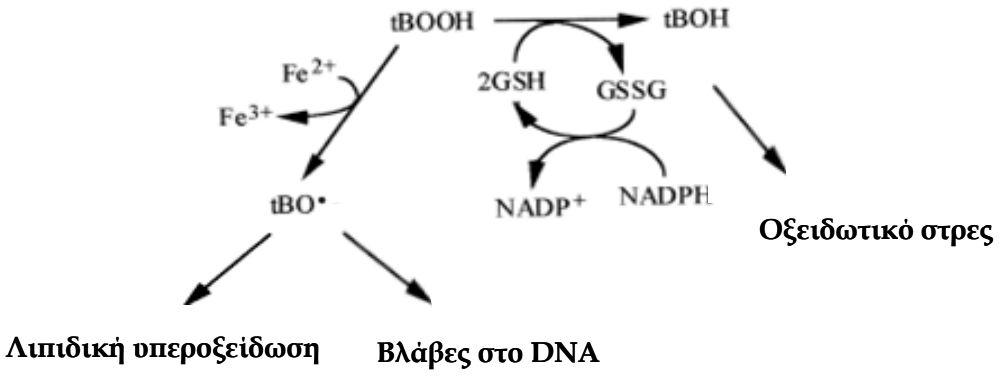
10.4. Μελέτη της δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των PBMCs μετά από την επαγωγή οξειδωτικού στρες

Για την εκτίμηση της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των PBMCs παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα, τα κύτταρα μετά την απομόνωση και την 24-ωρη επώασή τους σε 20 mL θρεπτικό μέσου RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS στους 37°C, μετρούνται με την χρήση του κυτταρόμετρου τύπου Neubauer. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα τοποθετούνται σε 24-

θέσεων πλάκες ανάπτυξης κυττάρων της εταιρίας Corning (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Για την επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH.

10.4.1. Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH

Ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH είναι ένα οργανικό υδροπεροξείδιο. Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών στα κύτταρα (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του t-BOOH που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 34. Έχει παρατηρηθεί ότι ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH οξειδώνει την GSH, μεσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Sies and Summer, 1975; Martín et al., 2000; Lima et al., 2006). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα τα Fe^{2+} οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών $tBO^{\bullet}$ (Martín et al., 2000; Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες $tBO^{\bullet}$ (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του t-BOOH με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξείδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Εικόνα 34) (Martín et al., 2000; Latour et al., 1995).



Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

10.4.2. Εκτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων

Για την εκτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα, όταν αυτά βρίσκονται υπό την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα, αριθμός $8x10^6$ κυττάρων PBMCs (2 mL) προστίθενται στις θέσεις της πλάκας 24-θέσεων σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και απουσία ορού FBS. Για την παρατήρηση της δράσης των εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν μη

κυτταροτοξικές για τα PBMCs συγκεντρώσεις όπως προσδιορίστηκε από την παραπάνω πειραματική διαδικασία. Για την επαγωγή οξειδωτικού στρες στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH.

Πιο αναλυτικά μετά την προσθήκη των κυττάρων στην πλάκα, ακολουθεί η προσθήκη των εκχυλισμάτων (20 μL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (5, 10 μg/mL και 400, 800 μg/mL) και του οξειδωτικού παράγοντα, t-BOOH 80 μM (20 μL). Τα κύτταρα επωάζονται για 2 h σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 απουσία ορού FBS. Τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα μόνα τους στο θρεπτικό υλικό αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα και τον οξειδωτικό παράγοντα (80 μM t-BOOH) αποτελούν το θετικό μάρτυρα. Ακόμη τα κύτταρα επωάστηκαν μόνο παρουσία των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων και απουσία του οξειδωτικού παράγοντα. Ακόμη, τα διαλύματα των εκχυλισμάτων πριν από την προσθήκη τους, αποστειρώνονται μετά από πέρασμα με την βοήθεια σύριγγας από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μm. Η δράση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος εξεταζόταν εις τριπλούν σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

Μετά την επώαση τα κύτταρα συλλέγονται από την πλάκα και ακολουθεί φυγοκέντρησή τους στα 3000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ίζημα των κυττάρων συλλέγεται. Ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,01 M, pH 7,4) που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 3000 g για 5 min στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται μετά από επίδραση σε υπερήχους για 1 min με περιοδικές διακοπές των 10 sec. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 15 min στους 4°C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Στη συνέχεια αμέσως μετά, ακολούθησε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.

Για την μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των κύτταρων όταν βρίσκονται υπό την επίδραση και μη οξειδωτικού παράγοντα, στο κυτταροπλασματικό αιώρημα που απομονώθηκε με την παραπάνω διαδικασία προσδιορίστηκαν η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των κυττάρων και οι συγκεντρώσεις της GSH και της GSSG.

Η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα που επιλέχθηκε (80 μM) δεν ήταν κυτταροτοξική για το χρονικό διάστημα της επώασης (2h) ωστόσο προκαλούσε επαγωγή

του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα μετά από δοκιμή διάφορων συγκεντρώσεων t-BOOH, 2 h επώασης των κυττάρων με 80 μM t-BOOH οδήγησαν σε μείωση των συγκεντρώσεων της GSH και αύξηση της GSSG αντίστοιχα σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ακόμη, ο λόγος GSH/GSSG μειώνεται και η TAC αυξάνεται υποδεικνύοντας την επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των PBMCs μετά από την επαγωγή οξειδωτικού στρες

Για την εκτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων, παρουσία και απουσία οξειδωτικού παράγοντα, προσδιορίστηκαν η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων (TAC), και οι συγκεντρώσεις της GSH και της GSSG καθώς και ο λόγος GSH/GSSG. Η σύγκριση των δεικτών μετά από 2 h επώασης με τα εκχυλίσματα απουσία του οξειδωτικού παράγοντα έγινε με βάση τον αρνητικό μάρτυρα (μόνο PBMCs), ενώ παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα με το θετικό μάρτυρα (PBMCs και t-BOOH). Η σύγκριση των τιμών των δεικτών υπολογίστηκε με το παρακάτω τύπο.

$$\% \text{ διαφορά} = [(A_0 - A_\delta)/A_0]$$

A_0: Μέση τιμή του δείκτη του κάθε φορά αρνητικού μάρτυρα ή θετικού μάρτυρα ανάλογα με τον οξειδωτικό παράγοντα.

A_δ: Μέση τιμή του δείκτη του δείγματος (συγκέντρωση εκχυλίσματος) παρουσία ή απουσία του οξειδωτικό παράγοντα.

10.6. Μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στα PBMCs

Για τη μελέτη της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH κυτταροτοξικότητα, πραγματοποιήθηκε αρχικά καμπύλη κυτταροτοξικότητας διάφορων συγκεντρώσεων του t-BOOH. Πιο αναλυτικά, μετά την απομόνωση και τη μέτρηση των PBMCs, $2x10^6$ κύτταρα (2 mL) προστίθενται στις θέσεις της πλάκας 24-θέσεων σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και απουσία ορού FBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 2 h με διαφορετικές συγκεντρώσεις t-BOOH (80, 100, 200, 400, 800 και 1000 μM). Οι θέσεις που περιέχουν μόνο κύτταρα αποτελούν το μάρτυρα. Η κυτταροτοξική δράση των συγκεντρώσεων του t-BOOH προσδιορίζεται με την μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων, μετά την επώαση, σε κυτταρόμετρο τύπου Neubauer ύστερα από

χρώση των κυττάρων με την χρωστική trypan blue (0,1% σε διάλυμα φωσφορικών PBS 0,1 M, pH 7,4). Η δράση κάθε συγκέντρωσης οξειδωτικού παράγοντα εξεταζόταν εις τριπλούν σε τουλάχιστον δύο πειραματικές διαδικασίες.

Για τη εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων, όμοια με παραπάνω, $2x10^6$ κύτταρα επωάζονται για 2 h με τις ίδιες συγκεντρώσεις t-BOOH και με παρουσία των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων (5, 10 μg/mL και 400, 800 μg/mL). Οι θέσεις που περιέχουν μόνο κύτταρα αποτελούν το μάρτυρα και οι θέσεις που περιέχουν τις συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα (80, 100, 200, 400, 800 και 1000 μM) αποτελούν τους θετικούς για κάθε συγκέντρωση μάρτυρες. Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίζεται με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που υπάρχουν στην πλάκα μετά την επώαση, σε σύγκριση με του κάθε φορά θετικούς μάρτυρες. Όμοια η μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων γίνεται ύστερα από χρώση των κυττάρων με την χρωστική trypan blue. Η δράση της κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος εξεταζόταν εις τριπλούν σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

10.7. Ποσοτικός προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στα PBMCs

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην κυτταροτοξική επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξειδωτικού παράγοντα εκφράζεται ως το ποσοστό μείωσης του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων που παραμένουν μετά την επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα. Το ποσοστό μείωσης του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% = [(N^o_\theta - N^o_\delta)/ N^o_\theta]x100$$

N^o_θ: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του κάθε φορά θετικού μάρτυρα (PBMCs και 80, 100, 200, 400, 800 ή 1000 μM t-BOOH).

N^o_δ: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του δείγματος (PBMCs, εκχύλισμα και t-BOOH).

11. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης και δεικτών εκτίμησης οξειδωτικού στρες

Χημικά αντιδραστήρια για τους δείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες

Τα χημικά αντιδραστήρια 5,5΄δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζίλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA), NADPH, αναγωγάση της γλουταθειόνης από ζυμομύκητα (glutathione reductase, GR), η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG), 2-βινυλ-πυριδίνη (2-vinyl-pyridine) και το αντιδραστήριο Bradford αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (trichloracetic acid, TCA) και το διάλυμα H_2O_2 (30% w/v) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany).

11.1. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H_2O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μL προστίθενται

κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχηση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

11.2. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έγινε με βάση την μέθοδο των Jannaszewska και Bartosz (Jannaszewska & Bartosz, 1984). Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των συστατικών του προς εξέταση δείγματος με την ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ($DPPH^{\bullet}$). Στη συγκεκριμένη περίπτωση βασίζεται στην ικανότητα των συστατικών κυτταροπλασματικού αιωρήματος να εξουδετερώνουν την ρίζα $DPPH^{\bullet}$ και να μειώνουν την τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονται 50 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος 450 μL 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) και 500 μL διαλύματος 0,1 mM ρίζας $DPPH^{\bullet}$ (50 μM τελική συγκέντρωση ρίζας). Τα δείγματα που περιέχουν μόνο τη ρίζα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) αποτελούν το μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας αντιοξειδωτικής δράσης αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν 50 μM ασκορβικού οξέος, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) και 500 μL διαλύματος 0,1 mM ρίζας $DPPH^{\bullet}$. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 20000 g για 3 min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως τα μmoL της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ που ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταροπλασματικού αιωρήματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$TAC\ (\mu moL\ DPPH^{\bullet}/\ mg\ \text{πρωτεΐνης}) = [((A_0 - A_\delta)/A_0) \times 0{,}05 \times 20]/C_\delta$$

A_0: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (κυτταροπλασματικό αιώρημα).

Τιμή 0,05: Η συγκέντρωση μmol /ml ρίζας $DPPH^{\bullet}$ στην αντίδραση.

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}$/ μL αιωρήματος [1000 μL /20 μL]).

C_δ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων που περιέχουν το ασκορβικό οξύ (θετικός μάρτυρας) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του μάρτυρα. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του μάρτυρα (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού μάρτυρα (η μικρότερη τιμή).

11.3. Προσδιορισμός της δραστικότητας της CAT

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της CAT στα δείγματα έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984). Η CAT είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο (Halliwell, 2005). Το H_2O_2 απορροφά στα 240 nm. Παρουσία CAT στο δείγμα το H_2O_2 μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο με αποτέλεσμα να μειώνεται η τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 3 mL στο οποίο περιέχονται 150 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος 2845 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37°C. Πέντε μL από διάλυμα H_2O_2 30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτική απορρόφηση στα 240 nm (UV) για 1,5 min. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται τη μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της CAT με το υπόστρωμα (H_2O_2). Η δραστικότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του H_2O_2.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit (μmol/min) της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{U CAT/ mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/40) \times 20 \times 1000]/C_{\delta}$$

$A\Delta_{\text{δείγματος}}$/min: Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\varepsilon_{240} H_2O_2$ ($M^{-1}cm^{-1}$): 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2.

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}$/ μL αιωρήματος [3000 μL /150 μL]).

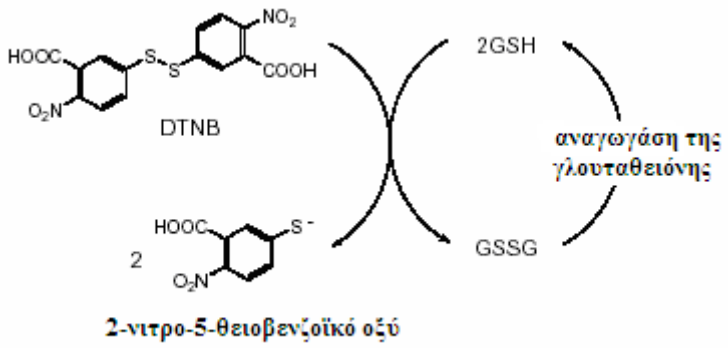
Τιμή 1000: Για την μετατροπή mol/L σε μmol/mL.

C_{δ}: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

11.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH στα δείγματα κυτταροπλασματικού αιωρήματος έγινε με βάση την μέθοδο του Tietze (Tieze, 1969). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH βασίζεται στην οξείδωση της GSH που βρίσκεται στο κυτταροπλασματικό αιώρημα από το 5,5΄δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH του δείγματος αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ με βάση την παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 35), το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

Πιο αναλυτικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GSH στα δείγματα η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονται 520 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 8), 150 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος και 330 μL διαλύματος DTNB 1 mM. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min και στην συνέχεια ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταροπλασματικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.



Εικόνα 35: Οξείδωση της GSH σε GSSG με ταυτόχρονη μετατροπή του DTNB σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο δείγμα εκφράζεται ως nmol της GSH ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmoL GSH/ mg πρωτεΐνης} = [((A_\delta - A_0)/13{,}6) \times 6{,}6 \times 1000]/C_\delta$$

A_δ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

εGSH ($mM^{-1}cm^{-1}$): 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της GSH.

Τιμή 6,6: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{τελ.αντίδρασης}$/ μL αιωρήματος [1000 μL /150 μL]).

Τιμή 1000: Για την μετατροπή mol/L σε μmol/mL.

$C_δ$: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

11.5. ***Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG***

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG βασίζεται στην ίδια αρχή προσδιορισμού της συγκέντρωσης της GSH (Tieze 1969). Ο προσδιορισμός της GSSG γίνεται έμμεσα και βασίζεται στην αναγωγή της GSSG σε GSH μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Η GSH οξειδώνεται από το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412 nm (Εικόνα 35). Στην αντίδραση προστίθεται το διάλυμα της 2-βινυλ-πυριδίνης το οποίο εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να παρεμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Για την μετατροπή της GSSG του δείγματος σε GSH και την δημιουργία του χρώματος προστίθεται το NADPH. Η αντίδραση είναι η εξής:

$$2\ GSH + NADP^+ \rightarrow GSSG + NADPH$$

Πιο αναλυτικά, αρχικά σε 50 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος (pH 7,4) προστίθενται 5 μL αραιωμένου 1/100 διαλύματος 2-βινυλ-πυριδίνης. Τα δείγματα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 600 μL 143 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100 μL διαλύματος 3 mM NADPH, 100 μL διαλύματος DTNB 10 mM, 189 μL H_2O και 10 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος που έχει επωαστεί με το 2-vinyl-pyridine. Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστίθενται 1 μL ενζύμου GR. Αμέσως μετά την προσθήκη τους ενζύμου ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm για 3 min. Τα δείγματα χωρίς το κυτταροπλασματικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Ο προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης στα δείγματα υπολογίζεται μέσω πρότυπου δειγμάτων που περιέχουν 75 μL διαλύματος οξειδωμένης γλουταθειόνης 10 μmol/L.

Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο δείγμα εκφράζεται ως nmol της GSSG ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >2-4μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Ως δείκτης εκτίμησης οξειδωτικού στρες

προσδιορίστηκε και ο λόγος GSH/GSSG. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmoL GSSG/ mg πρωτεΐνης} = \{[((A_\delta - A_0) \times 0{,}75)/(A_\pi - A_0)) \times 100]/2\}/C_\delta$$

A_δ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

A_π: Η μέση τιμή της απορρόφησης του πρότυπου δείγματος.

Τιμή 0,75: Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης του πρότυπου δείγματος μmol/L (nmol/mL)

Τιμή 100: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}$/ μL αιωρήματος [1000 μL /10 μL]).

Τιμή 2: Ώστε να συνυπολογιστεί η στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (2 GSH → 1 GSSG)

C_δ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

11.6. *Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υποροξείδωσης TBARS*

Από τους πιο συνηθισμένους δείκτες εκτίμησης της οξείδωσης των λιπιδίων είναι η συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, TBARS (Keles et al., 2001; Therond et al., 2000). Ο δείκτης αντικατοπτρίζει κυρίως την μηλονική διαλδεΰδη (MDA) που αποτελεί το κύριο προϊόν της οξείδωσης των λιπιδίων, και έχει την ικανότητα να αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Πιο αναλυτικά για 400 μL κυτταρικού αιωρήματος αναμειγνύεται με 500 μL διαλύματος 35% TCA και 500 μL διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 mL διαλύματος 2 M Na_2SO_4 και 55 mM θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 mL διαλύματος 70% (TCA). Μετά από ανάδευση, 1 mL του κάθε δείγματος φυγοκεντρείται στα 15000 g για 3 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Η

μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [((A_\delta - A_0)/ 0,156) \times 7,5]/C_\delta$$

A_δ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ε_{530}MDA ($\mu M^{-1}cm^{-1}$): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονυλαλδεϋδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}$/ μL αιωρήματος [3000 μL /400 μL]).

C_δ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

12. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά οι παράμετροι της περιγραφικής στατιστικής η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μέθοδοι επαγωγικής στατιστικής.

Η ανεξάρτητη μεταβλητή σε όλες τις πειραματικές μεθόδους ήταν οι συγκεντρώσεις του προς εξέταση δείγματος (φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα και καθαρή πολυφαινολική ένωση).

Στις μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών $OH^\bullet$ και $ROO^\bullet$, της επίδρασης στην ενζυμική δραστικότητα και στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι καθώς και της εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης και της κυτταροτοξικότητας, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Dunnet. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p<0,05$.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η εξουδετέρωση των ριζών $DPPH^\bullet$, $ABTS^{\bullet+}$ και $O_2^{\bullet-}$.
- Το ποσοστό αναστολής της επαγόμενης από ρίζες $OH^\bullet$ και $ROO^\bullet$ πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.
- Η αύξηση/μείωση της ενζυμικής δραστικότητας των ενζύμων XO, CAT και SOD.

- Το ποσοστό αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο DNA.
- Η μείωση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών His^+, επαγόμενες από την μπλεομυκίνη.
- Η μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων Hep2 και PBMCs μετά την ολοκλήρωση των επωάσεων.

Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής κάθε φορά εξαρτημένης μεταβλητής που προκαλούσαν τα εξεταζόμενα δείγματα και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman με $p<0,01$.

Για την εκτίμηση των επιδράσεων της ανεξάρτητης μεταβλητής στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2 και PBMCs η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω της δοκιμασία ομογένειας δύο ανεξάρτητων δειγμάτων Mann-Whitney.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων (TAC).
- Η μεταβολή της δραστικότητας της CAT.
- Η μεταβολή της συγκέντρωσης της GSH, της GSSG.
- Η μεταβολή του λόγου GSH/GSSG.
- Η μεταβολή του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARs.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε για $p<0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Βιολογικές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών της οικογένειας Leguminosae

3.1.1. Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των φυτικών εκχυλισμάτων

Αρχικά προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των 17 υδατικών και 17 μεθανολικών φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau. Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα ψυχανθών που δοκιμάστηκαν περιείχαν, πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες αλληλεπιδρούσαν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau (Πίνακας 6). Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται ως mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος.

Τα εκχυλίσματα με το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο ήταν το υδατικό και μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού). Τα εκχυλίσματα των σπερμάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* (κοινό φασόλι) και το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus clymenum* (φάβα Σαντορίνης) ήταν τα εκχυλίσματα με το μικρότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (Πίνακας 6). Το συνολικό περιεχόμενο διαφέρει ανάμεσα στα εκχυλίσματα λόγω των διαφορετικών φυτών και τμημάτων των φυτών από τα οποία προέκυψαν. Οι διαφορές μεταξύ των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων αποδίδονται στη διαφορετική τους πολυφαινολική σύσταση, η οποία οφείλεται στη διαφορετική διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στο νερό και τη μεθανόλη.

Πίνακας 6: Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	**Τμήματα των φυτών**	**Μεθανολικά εκχυλίσματα**	**Υδατικά εκχυλίσματα**
		TPC (mg GA/g εκχυλίσματος)[α]	
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα[β]	89	100
Lupinus albus	Περικάρπιο	66	28
Lupinus albus	Πόα	60	39
Lupinus albus	Σπέρματα	41	22
Lotus edulis	Πόα	33	22
Lathyrus sativus	Πόα	32	-
Vicia faba	Πόα	30	32
Phaseolus vulgaris	Πόα	18	28
Lens culinaris	Πόα	16	50
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	13	21
Lotus longisiliquosus	Πόα	11	27
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	9	15
Lotus edulis	Καρποί	8	14
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	7	12
Lens culinaris	Σπέρματα	7	7
Tetragonolobus purpureus	Πόα	5	13
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	3	2
Lathyrus clymenum	Πόα	-	3

[α]Πόα: υπέργεια τμήματα των φυτών. [β]TPC: συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος).

3.1.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων

Με σκοπό την μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων των φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών ως πιθανή πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων, αρχικά μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με διαφορετικές ρίζες. Όλα τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα ψυχανθών εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ και $O_2^{\bullet-}$.

Εξουδετέρωση της ρίζας DPPH$^{\bullet}$

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όλα τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών ήταν αποτελεσματικοί δεσμευτές, αδρανοποιητές της ρίζας $DPPH^{\bullet}$. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 0,056 σε 7,6 mg/mL (Πίνακες 7, 8). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων διέφερε ανάμεσα στα εκχυλίσματα των διαφορετικών φυτών και ανάμεσα στα διαφορετικά τμήματα του ίδιου φυτού. Διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκαν και ανάμεσα στα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα (Γράφημα 1).

Τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH$^{\bullet}$. Οι τιμές IC_{50} για το υδατικό και το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν 80 μg/mL και 56 μg/mL αντίστοιχα. Τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ως προς τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ είχαν το μεθανολικό εκχύλισμα σπερμάτων του φυτού *Lens culinaris* (φακές) και το υδατικό εκχύλισμα σπερμάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* (φασόλι) με τιμές IC_{50} 6,8 και 7,6 mg/mL αντίστοιχα. Ακόμη, με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας και της συγκέντρωσής τους (Πίνακες 7, 8).

Πίνακας 7: Ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	**Τμήματα των φυτών**	**Μεθανολικά εκχυλίσματα**		
		IC_{50} (mg/mL)	**r**[α]	**nmol DPPH$^{\bullet}$/μg πολυφαινολών**[β]
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα[γ]	0,056 ± 0,004[δ]	0,957	10
Vicia faba	Πόα	0,25 ± 0,03	0,853	6,7
Lathyrus sativus	Πόα	0,6 ± 0,07	0,943	2,6
Lupinus albus	Πόα	0,7 ± 0,07	0,926	1,2
Phaseolus vulgaris	Πόα	0,7 ± 0,14	0,904	4
Lens culinaris	Πόα	1,25 ± 0,04	0,941	2,5
Lupinus albus	Περικάρπιο	1,6 ± 0,07	0,949	0,5
Tetragonolobus purpureus	Πόα	1,7 ± 0,07	0,912	2,3
Lotus longisiliquosus	Πόα	2,1 ± 0,07	0,928	2,2
Lotus edulis	Πόα	2,4 ± 0,07	0,891	0,6
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	2,7 ± 0,07	0,970	2,6
Lotus edulis	Καρποί	2,7 ± 0,07	0,947	2,3
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	3,1 ± 0,07	0,927	1,8
Lupinus albus	Σπέρματα	3,7 ± 0,07	0,968	0,3
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	4,7 ± 0,2	0,859	3,5
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	5,5 ± 0,14	0,937	1,8
Lens culinaris	Σπέρματα	6,8 ± 0,2	0,805	1,1
Lathyrus clymenum	Πόα	-	-	-
Ελαιοευρωπαΐνη[ε]	-	0,065 ± 0,002	0,940	-

[α]r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. [β]Ειδική δραστικότητα: nmol ρίζας DPPH$^{\bullet}$ που εξουδετερώνονται/ μg πολυφαινολών του εκχυλίσματος. [γ]Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. [δ]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. [ε]Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μορίου με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Πίνακας 8: Ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$

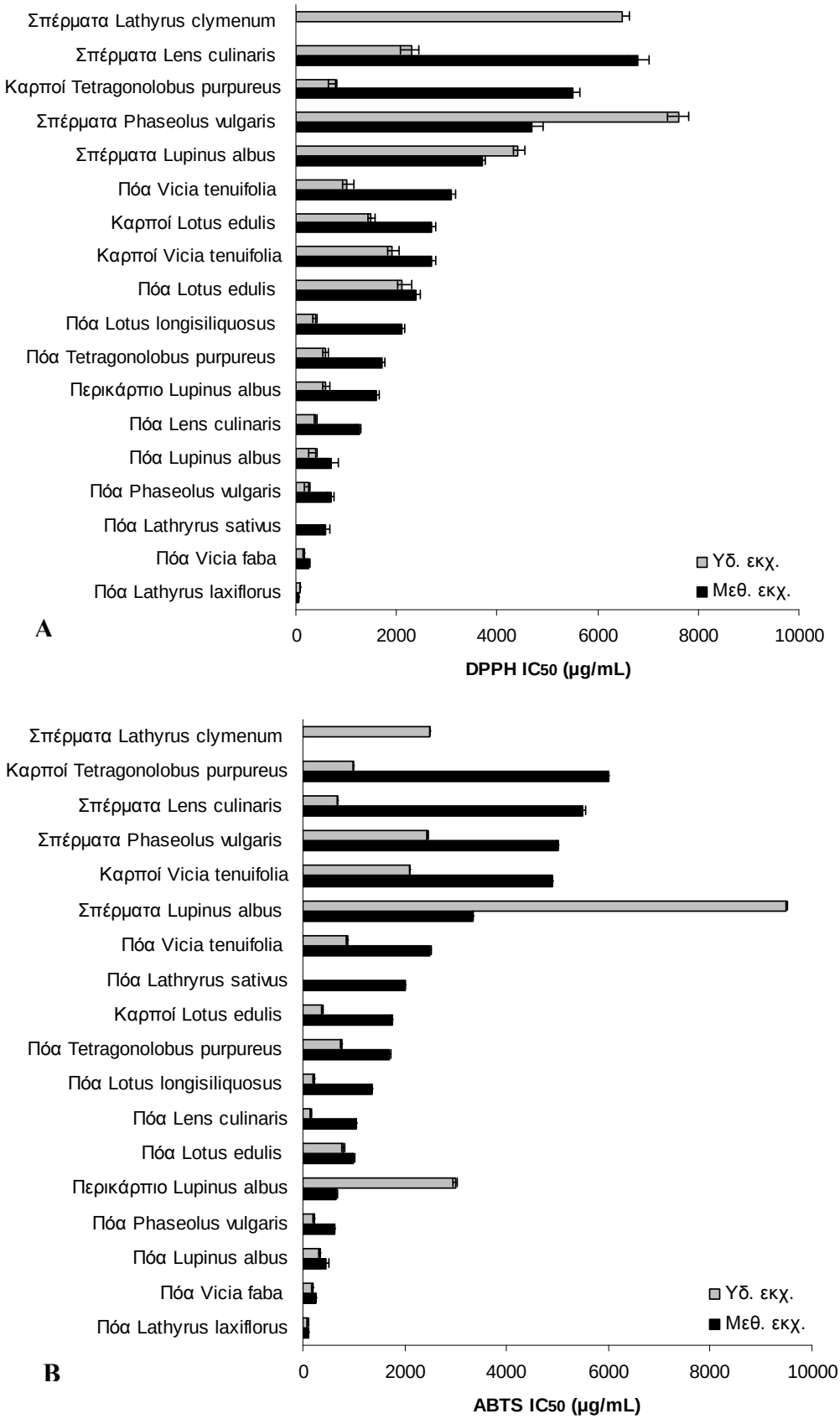
Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	**Τμήματα των φυτών**	**Υδατικά εκχυλίσματα**		
		IC_{50} (mg/mL)	**r$^{\alpha}$**	**nmol DPPH$^{\bullet}$/μg πολυφαινολών$^{\beta}$**
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα$^{\gamma}$	0,08 ± 0,004$^{\delta}$	0,919	6,3
Vicia faba	Πόα	0,17 ± 0,01	0,918	9,2
Phaseolus vulgaris	Πόα	0,25 ± 0,04	0,871	7,1
Lotus longisiliquosus	Πόα	0,4 ± 0,014	0,870	4,6
Lupinus albus	Πόα	0,4 ± 0,04	0,872	3,2
Lens culinaris	Πόα	0,4 ± 0,04	0,836	2,5
Tetragonolobus purpureus	Πόα	0,6 ± 0,04	0,924	4
Lupinus albus	Περικάρπιο	0,6 ± 0,07	0,961	3
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	0,8 ± 0,03	0,977	4,8
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	1 ± 0,014	0,973	3,3
Lotus edulis	Καρποί	1,5 ± 0,07	0,899	2,4
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	1,9 ± 0,14	0,919	2,2
Lotus edulis	Πόα	2,1 ± 0,2	0,915	1,1
Lens culinaris	Σπέρματα	2,3 ± 0,14	0,903	3,1
Lupinus albus	Σπέρματα	4,4 ± 0,014	0,951	0,5
Lathyrus clymenum	Πόα	6,5 ± 0,14	0,752	2,6
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	7,6 ± 0,2	0,902	3,3
Lathyrus sativus	Πόα	-	-	-
Ελαιοευρωπαΐνη$^{\varepsilon}$	-	0,065 ± 0,002	0,940	

$^{\alpha}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\beta}$Ειδική δραστικότητα: nmol ρίζας DPPH$^{\bullet}$ που εξουδετερώνονται/ μg πολυφαινολών του εκχυλίσματος. $^{\gamma}$Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. $^{\delta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\varepsilon}$Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μορίου με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Με βάση τις τιμές TPC των εκχυλισμάτων παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα έχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε ενώσεις με φαινολικές ομάδες οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 6). Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων αποδίδονται στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Ωστόσο, με βάση τις τιμές της ειδικής δραστικότητας των εκχυλισμάτων (nmol DPPH$^{\bullet}$ που εξουδετερώνονται/μg πολυφαινολών) απέναντι στην εξουδετέρωση της ρίζας σημαντικό ρόλο παίζει και η ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων (Πίνακες 7, 8).

Εξουδετέρωση της ρίζας ABTS$^{\bullet+}$

Όλα τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών ήταν και αποτελεσματικοί δεσμευτές, αδρανοποιητές της ρίζας ABTS$^{\bullet+}$. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 0,095 σε 9,5 mg/mL (Πίνακες 9, 10). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων απέναντι στη ρίζα ABTS$^{\bullet+}$ ήταν όμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν απέναντι στη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Διαφορετική ικανότητα εξουδετέρωσης των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών απέναντι στις ρίζες $DPPH^{\bullet}$ (**A**) και $ABTS^{\bullet+}$ (**B**). Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα.

Τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν τα πιο δραστικά έχοντας τιμές IC_{50} 100 μg/mL και 95 μg/mL για το υδατικό και το μεθανολικό εκχύλισμα αντίστοιχα. Ακόμη με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας και της συγκέντρωσής τους (Πίνακες 9, 10). Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων πιθανόν οφείλονται στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Ωστόσο, με βάση τις τιμές της ειδικής δραστικότητας των εκχυλισμάτων (nmol $ABTS^{\bullet+}$ που εξουδετερώνονται/μg πολυφαινολών) απέναντι στην εξουδετέρωση της ρίζας σημαντικό ρόλο παίζει και η ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων (Πίνακες 9, 10).

Πίνακας 9: Ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών να εξουδετερώνουν την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	**Τμήματα των φυτών**	**Μεθανολικά εκχυλίσματα**		
		IC_{50} (mg/mL)	**r^{α}**	**nmol $ABTS^{\bullet+}$ /μg πολυφαινολών$^{\beta}$**
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα$^{\gamma}$	0,1 ± 0,01$^{\delta}$	0,917	56
Vicia faba	Πόα	0,25 ± 0,003	0,983	67
Lupinus albus	Πόα	0,44 ± 0,08	0,982	19
Phaseolus vulgaris	Πόα	0,62 ± 0,01	0,984	45
Lupinus albus	Περικάρπιο	0,66 ± 0,02	0,980	11
Lotus edulis	Πόα	1 ± 0,01	0,960	15
Lens culinaris	Πόα	1,05 ± 0,01	0,982	30
Lotus longisiliquosus	Πόα	1,35 ± 0,02	0,982	34
Tetragonolobus purpureus	Πόα	1,7 ± 0,03	0,983	23
Lotus edulis	Καρποί	1,75 ± 0,02	0,982	36
Lathyrus sativus	Πόα	2 ± 0,01	0,953	8
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	2,5 ± 0,01	0,972	22
Lupinus albus	Σπέρματα	3,35 ± 0,001	0,983	4
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	4,9 ± 0,004	0,913	15
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	5 ± 0,003	0,953	33
Lens culinaris	Σπέρματα	5,5 ± 0,04	0,983	13
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	6 ± 0,01	0,983	17
Lathyrus clymenum	Πόα	-	-	-
Ελαιοευρωπαΐνη$^{\varepsilon}$	-	0,040 ± 0,005	0,983	-

$^{\alpha}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\beta}$Ειδική δραστικότητα: nmol ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ που εξουδετερώνονται/ μg πολυφαινολών του εκχυλίσματος. $^{\gamma}$Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. $^{\delta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\varepsilon}$Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Πίνακας 10: Ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών να εξουδετερώνουν την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	Τμήματα των φυτών	Υδατικά εκχυλίσματα		
		IC_{50} (mg/mL)	r^{α}	nmol $ABTS^{\bullet+}$ /μg πολυφαινολών$^{\beta}$
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα$^{\gamma}$	0,095 ± 0,005$^{\delta}$	0,982	53
Lens culinaris	Πόα	0,155 ± 0,01	0,960	65
Vicia faba	Πόα	0,19 ± 0,02	0,981	82
Phaseolus vulgaris	Πόα	0,22 ± 0,02	0,982	81
Lotus longisiliquosus	Πόα	0,22 ± 0,02	0,982	84
Lupinus albus	Πόα	0,33 ± 0,02	0,982	39
Lotus edulis	Καρποί	0,38 ± 0,02	0,982	94
Lens culinaris	Σπέρματα	0,67 ± 0,002	0,982	107
Tetragonolobus purpureus	Πόα	0,76 ± 0,01	0,938	31
Lotus edulis	Πόα	0,79 ± 0,02	0,982	29
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	0,87 ± 0,02	0,982	38
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	2,1 ± 0,01	0,982	38
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	2,45 ± 0,006	0,991	20
Lathyrus clymenum	Πόα	2,5 ± 0,004	0,982	102
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	3 ± 0,004	0,982	67
Lupinus albus	Περικάρπιο	3 ± 0,04	0,982	6
Lupinus albus	Σπέρματα	9,5 ± 0,01	0,893	2
Lathyrus sativus	Πόα	-	-	-
Ελαιοευρωπαΐνη$^{\varepsilon}$	-	0,040 ± 0,005	0,983	-

$^{\alpha}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\beta}$Ειδική δραστικότητα: nmol ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ που εξουδετερώνονται/ μg πολυφαινολών του εκχυλίσματος. $^{\gamma}$Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. $^{\delta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\varepsilon}$Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

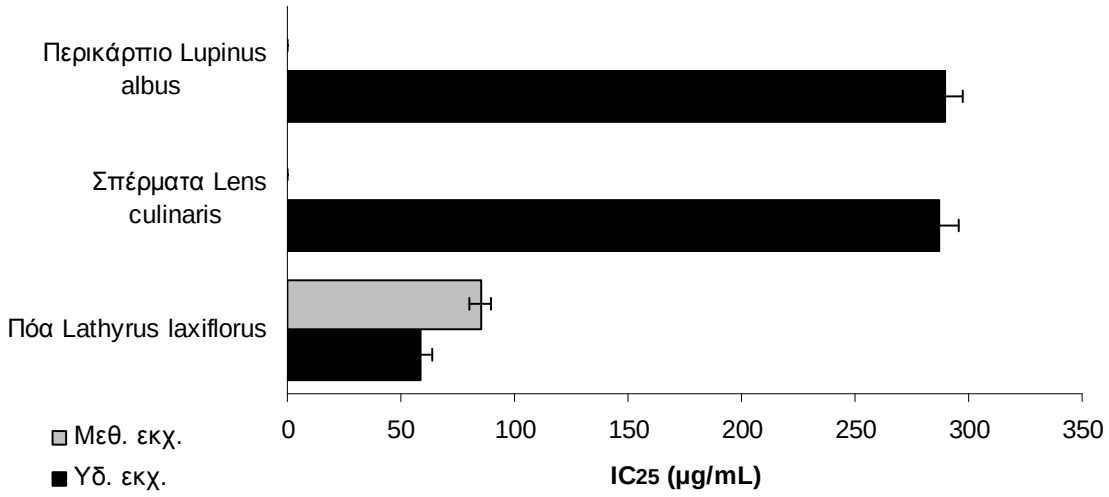
Εξουδετέρωση των ριζών $O_2^{\bullet-}$

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες ρίζες, τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να αδρανοποιούν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Μόνο 4 από τα 34 συνολικά εκχυλίσματα ήταν δραστικά απέναντι στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Πίνακας 11, Γράφημα 2). Τα εκχυλίσματα δεν μπόρεσαν να εξουδετερώσουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ κατά 50% στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Για τα δραστικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{25}, δηλαδή η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ κατά 25% (Πίνακας 11). Τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν και το υδατικό και το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, με τιμές IC_{25} 59 μg/mL και 85 μg/mL (Γράφημα 2). Μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα περικαρπίου του φυτού *Lupinus albus* και σπερμάτων του *Lens culinaris* είχαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μεθανολικά τους εκχυλίσματα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Εκχυλίσματα ψυχανθών που παρουσίασαν ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	**Τμήματα των φυτών**	**Μεθανολικά εκχυλίσματα IC_{25} (μg/mL)**	**Υδατικά εκχυλίσματα IC_{25} (μg/mL)**
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα[α]	85 ± 5[β]	59 ± 5
Lens culinaris	Σπέρματα	καμία δράση	287 ± 9
Lupinus albus	Περικάρπιο	καμία δράση	290 ± 7

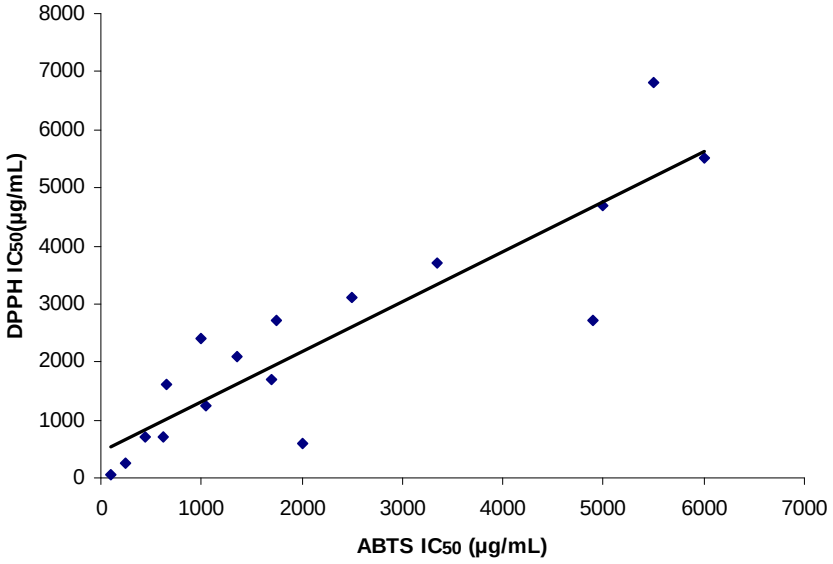
[α]Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. [β]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$.



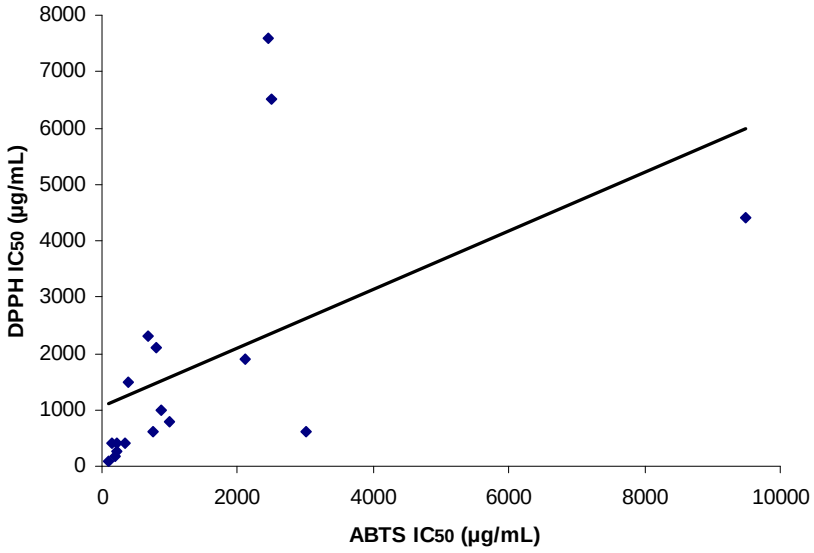
Γράφημα 2: Εκχυλίσματα ψυχανθών που είχαν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $O_2^{\bullet}$. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν.

Συνολικά η δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ και $O_2^{\bullet-}$ υποδεικνύει, ότι στα εκχυλίσματα υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότες ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου. Οι διαφορές ανάμεσα στη δράση των εκχυλισμάτων, αποδίδονται στο ότι τα εκχυλίσματα προέρχονται από διαφορετικά φυτά και τμήματα φυτών καθώς από το γεγονός ότι η εκχύλιση έγινε με διαφορετικούς διαλύτες. Τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) παρουσίασαν τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται στο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο αλλά και στις επιμέρους περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις (Πίνακες 6-11).

Τα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικοί αδρανοποιητές των ριζών $DPPH^{\bullet}$ και $ABTS^{\bullet+}$ παρά των ριζών $O_2^{\bullet-}$. Η διαφορετική ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών αποδίδεται στη διαφορετική φύση των ριζών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά τον κοινό μηχανισμό εξουδετέρωσης των ριζών $DPPH^{\bullet}$ και $ABTS^{\bullet+}$ παρατηρήθηκαν διαφορές στη δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες (Γράφημα 1). Ωστόσο, υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r) στα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων παρατηρήθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητική συσχέτιση στη δραστικότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων απέναντι στις δύο ρίζες (r=0,875 για $p<0,01$). Στα υδατικά εκχυλίσματα η συσχέτιση δεν ήταν τόσο μεγάλη (r= 0,786 για $p<0,01$) σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα (Γράφημα 3).



A



B

Γράφημα 3: Συσχέτιση της δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες $DPPH^{\bullet}$ και $ABTS^{\bullet+}$. (**A**) Σύγκριση δράσης μεθανολικών εκχυλισμάτων. (**B**) Σύγκριση δράσης υδατικών εκχυλισμάτων.

3.1.3. Αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ πρόκληση θραυσμάτων στο DNA

Καθώς τα φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, στη συνέχεια εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επιβλαβή δράση ελεύθερων ριζών στο DNA. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (Bluescript-SK+). Οι ρίζες $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA αλλάζοντας την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική. Η προστατευτική δράση βασίστηκε στην παρεμπόδιση αυτής της αλλαγής διαμόρφωσης.

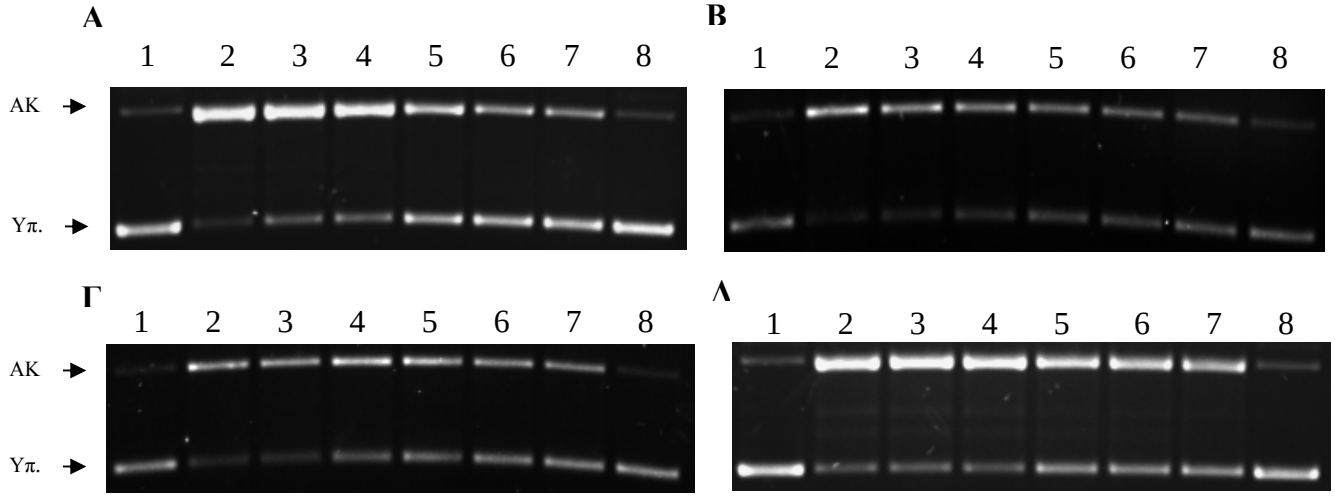
Η θερμική διάσπαση της ένωσης AAPH και η φωτόλυση του H_2O_2 παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ριζών $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$, αντίστοιχα. Από τα 31 συνολικά εκχυλίσματα ψυχανθών που δοκιμάστηκαν, η πλειοψηφία τους παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στη δράση και των δύο ριζών.

Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$

Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στην ικανότητα των ριζών να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Πιο αναλυτικά, 11 μεθανολικά και 10 υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να αναστέλλουν την επαγόμενη από ρίζες $OH^{\bullet}$ πρόκληση θραυσμάτων στο πλασμιδιακό DNA. Με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας αναστολής της δράσης των ριζών και της συγκέντρωσής τους ($r = 0,774$-$0,981$ για $p<0,01$) (Πίνακας 12). Ωστόσο, η δράση των περισσότερων εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (400, 800 και 1600 μg/mL) (Πίνακας 12).

Τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασαν την πιο ισχυρή προστατευτική δράση με τιμές IC_{50} 230 και 1250 μg/mL για το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα αντίστοιχα (Πίνακας 12, Εικόνα 36 Α, Β). Ένα ακόμη ισχυρό εκχύλισμα το οποίο παρουσίασε προστατευτική δράση από τη συγκέντρωση 200 μg/mL ήταν το εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tetragonolobus purpureus* (Πίνακας 12, Εικόνα 36 Γ). Ωστόσο, το παραπάνω εκχύλισμα, όπως και τα υπόλοιπα δραστικά εκχυλίσματα, δεν ήταν ικανό να αναστείλει τη μετατροπή της υπερελικωμένης

διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική από τη δράση των ριζών OH• κατά 50% στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν 20-42% αναστολή στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 1600 μg/mL. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* που παρουσίασε 34% αναστολή της δράσης των ριζών στη συγκέντρωση 1600 μg/mL (Πίνακας 12, Εικόνα 36 Δ). Ακόμη, τα εκχυλίσματα μόνα τους δεν είχαν καμία επίδραση στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.



Εικόνα 36: Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων ψυχανθών απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες OH• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. (**A**) Μεθανολικό εκχύλισμα και (**B**) Υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*. (**Γ**) Υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tetragonolobus purpureus*. (**Δ**) Υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας, στήλη 2: θετικός μάρτυρας (μόνο ρίζες OH•), στήλες 3-7: ρίζες OH• και το εκχύλισμα σε 100, 200, 400, 800 και 1600 μg/mL αντίστοιχα, στήλη 8: 1600 μg/mL εκχύλισμα μόνο. ΑΚ: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Υπ.: Υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Πίνακας 12: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων ψυχανθών στην επαγόμενη από ρίζες $OH^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Τμήματα των φυτών	Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	Μεθανολικά εκχυλίσματα: Συγκέντρωση (μg/mL) 100	200	400	800	1600	IC_{50}[β]	r[γ]	Υδατικά εκχυλίσματα: Συγκέντρωση (μg/mL) 100	200	400	800	1600	IC_{50}	r
		% Αναστολή[α]							% Αναστολή						
Πόα	*Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*	14±3	21±3[*δ]	52±5[*]	62±4[*]	69±3[*]	230	0,966	11±1	23±1[*]	36±3[*]	44±3[*]	55±2[*]	1250	0,981
Πόα	*Phaseolus vulgaris*	10±3	10±3	31±4[*]	37±4[*]	38±2[*]	>1600	0,881	6±2	11±2	27±1[*]	29±3[*]	34±2[*]	>1600	0,934
Πόα	*Lens culinaris*	NI	NI	31±3[*]	32±2[*]	33±3[*]	>1600	0,848	NI	NI	19±1[*]	18±1[*]	27±3[*]	>1600	0,758
Καρποί	*Lotus edulis*	NI	NI	32±1[*]	34±2[*]	37±3[*]	>1600	0,840	Καμία δράση[ε]					-	-
Πόα	*Lotus longisiliquosus*	NI	8±1	30±2[*]	33±1[*]	33±1[*]	>1600	0,905	NI	NI	13±5	14±4	20±3[*]	>1600	0,805
Πόα	*Vicia faba*	NI	NI	27±2[*]	29±3[*]	32±3[*]	>1600	0,774	NI	6±2	28±3[*]	31±2[*]	37±3[*]	>1600	0,960
Πόα	*Lotus edulis*	5±1	7±2	28±2[*]	35±1[*]	42±2[*]	>1600	0,974	NI	4±1	21±2[*]	22±2[*]	30±3[*]	>1600	0,931
Πόα	*Lathyrus sativus*	NI	NI	28±3	24±1[*]	31±2[*]	>1600	0,851	-	-	-	-	-	-	-
Πόα	*Tetragonolobus purpureus*	NI	NI	26±2[*]	27±2[*]	32±2[*]	>1600	0,768	9±4	18±1[*]	29±2[*]	38±3[*]	47±3[*]	>1600	0,975
Πόα	*Vicia tenuifolia* subsp. *stenophylla*	NI	NI	19±2[*]	19±1[*]	23±1[*]	>1600	0,776	Καμία δράση					-	-
Καρποί	*Tetragonolobus purpureus*	NI	NI	18±4	21±2[*]	23±3[*]	>1600	0,729	3±1	12±3	15±2	21±4[*]	26±3[*]	>1600	0,925
Καρποί	*Vicia tenuifolia* subsp. *stenophylla*	Καμία δράση					-	-	Καμία δράση					-	-
Σπέρματα	*Lupinus albus*	Καμία δράση					-	-	Καμία δράση					-	-
Περικάρπιο	*Lupinus albus*	Καμία δράση					-	-	Καμία δράση					-	-
Πόα	*Lupinus albus*	Δεν δοκιμάστηκε[ζ]					-	-	NI	NI	17±2[*]	16±1[*]	20±1[*]	>1600	0,859
Σπέρματα	*Phaseolus vulgaris*	Δεν δοκιμάστηκε					-	-	NI	NI	23±2[*]	19±1[*]	18±1[*]	>1600	0,681
Σπέρματα	*Lens culinaris*	Δεν δοκιμάστηκε					-	-	Καμία δράση					-	-
Πόα	*Lathyrus clymenum*	-	-	-	-	-	-	-	Καμία δράση					-	-
	Ελαιοευρωπαΐνη[η]	NI	11±2	23±2[*]	33±3[*]	42±3[*]	>1600	0,986							

[α]Ποσοστό αναστολής της επαγόμενης από τις ρίζες $OH^{\bullet}$ μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική.
[β]IC_{50}: (μg/mL).
[γ]r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$.
[δ]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του ποσοστού αναστολής τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.
[ε]Τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία δράση σε καμία εξεταζόμενη συγκέντρωση.
[ζ]Τα εκχυλίσματα δεν δοκιμάστηκαν λόγω της διάλυσής τους σε ποσοστό μεθανόλης που επηρεάζει τα αποτελέσματα.
[η]Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισχυρής προστατευτικής δράσης.
NI: 0% αναστολή. [*]Στατιστικά σημαντικό ποσοστό, $p<0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ρίζες $OH^{\bullet}$).

Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες ROO•

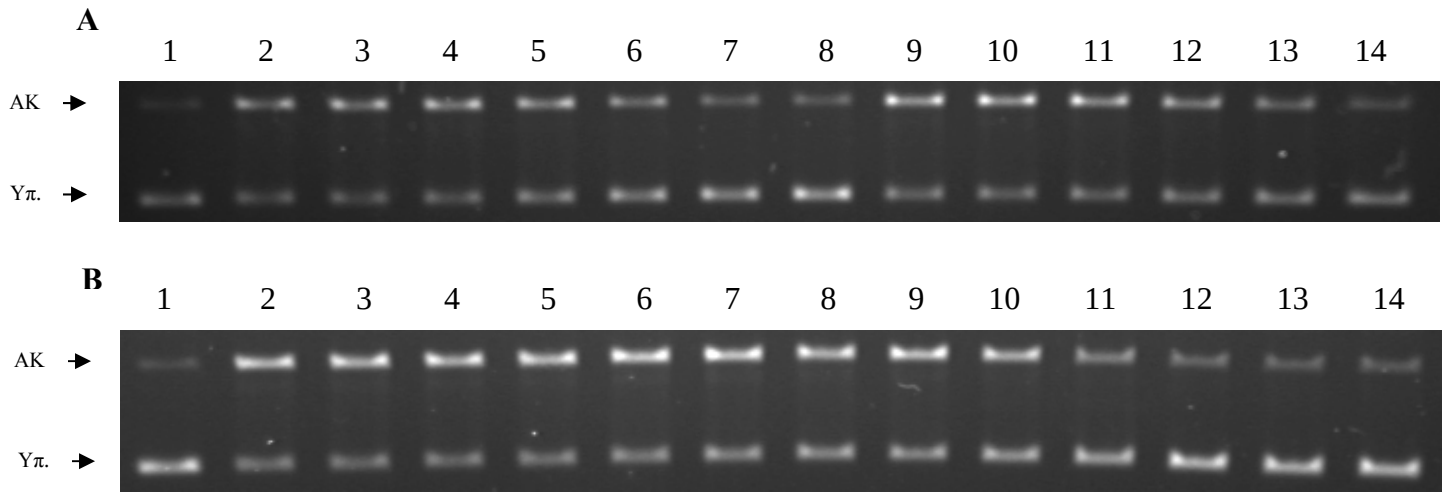
Όσον αφορά τη δράση των εκχυλισμάτων ψυχανθών απέναντι στις ρίζες ROO•, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων που δοκιμάστηκαν παρουσίασε και προστατευτική δράση απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA (Πίνακας 13). Τα εκχυλίσματα ήταν πιο δραστικά απέναντι στη δράση των ριζών ROO• καθώς παρουσίασαν προστατευτική δράση σε συγκεντρώσεις 5-200 μg/mL. Πιο αναλυτικά, 14 μεθανολικά και 14 υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να αναστέλλουν την επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση θραυσμάτων στο πλασμιδιακό DNA. Ακόμη με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας αναστολής της δράσης των ριζών και της συγκέντρωσής τους (r = 0,757-0,987 για p<0,01). Στην Εικόνα 37 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης της προστατευτικής δράσης των μεθανολικών εκχυλισμάτων καρπών και υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis* που παρουσίασαν σημαντική προστατευτική δράση (Εικόνα 37 Α). Μόνο τρία υδατικά εκχυλίσματα δεν είχαν καμία δράση σε καμία από εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα αυτά ήταν αυτά που προέκυψαν από τα σπέρματα και τα περικάρπια του *Lupinus albus* και τα υπέργεια τμήματα του *Lathrus clymenum* (Πίνακας 13).

Όμοια με τις ρίζες OH• τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασαν και την πιο ισχυρή προστατευτική δράση και απέναντι στις ρίζες ROO• με τιμές IC_{50} 6 και 5 μg/mL για το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα αντίστοιχα (Πίνακας 13). Από τα υπόλοιπα δραστικά εκχυλίσματα 12 μεθανολικά και 11 υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ποσοστό 48-99% αναστολής της δράσης των ριζών ROO• στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 200 μg/mL. Μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα σπερμάτων και το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lupinus albus* καθώς και το υδατικό εκχύλισμα σπερμάτων του *Phaseolus vulgaris* παρουσίασαν 16%, 26% και 18% αναστολή της δράσης των ριζών αντίστοιχα, στη συγκέντρωση 200 μg/mL (Πίνακας 13). Στην Εικόνα 37 παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης της προστατευτικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων σπερμάτων και υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris*, στα οποία φαίνεται χαρακτηριστικά η διαφορά της ισχύος στη δράση των δύο εκχυλισμάτων (Εικόνα 37 Β).

Πίνακας 13: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων ψυχανθών στην επαγόμενη από ρίζες ROO$^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Τμήματα των φυτών	Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	Μεθανολικά εκχυλίσματα: Συγκεντρώσεις (μg/mL) 5	10	20	50	100	200	IC_{50}^{β}	r^{γ}	Υδατικά εκχυλίσματα: Συγκεντρώσεις (μg/mL) 5	10	20	50	100	200	IC_{50}^{β}	r^{γ}
		% Αναστολή$^{\alpha}$								% Αναστολή							
Πόα	*Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*	40±2$^{*\delta}$	73±5*	89±6*	89±6*	93±7*	98±3*	6	0,851	50±6*	83±4*	84±2*	97±2*	99±1*	99±1*	5	0,852
Πόα	*Lathyrus sativus*	5±1	20±1*	38±3*	87±4*	96±2*	93±4*	25	0,985	-	-	-	-	-	-	-	-
Πόα	*Vicia faba*	9±1	13±2	39±4*	69±3*	78±4*	84±5*	28	0,979	10±1*	26±1*	58±1*	87±1*	93±1*	96±1*	16	0,991
Πόα	*Phaseolus vulgaris*	9±3	14±4	24±1*	56±2*	81±6*	93±4*	43	0,968	16±5	26±4*	57±4*	84±1*	87±1*	91±1*	16	0,987
Πόα	*Lotus edulis*	3±1	8±3	24±3*	50±3*	79±1*	90±4*	49	0,983	NI	NI	15±5	41±3*	67±4*	76±3*	64	0,919
Περικάρπιο	*Lupinus albus*	NI	9±4	28±3*	49±4*	64±2*	67±3*	52	0,975	Καμία δράση$^{\varepsilon}$						-	-
Πόα	*Lens culinaris*	9±3	9±2	20±2*	44±4*	61±3*	78±1*	65	0,971	8±2	14±2*	32±2*	67±3*	73±1*	84±3*	32	0,984
Πόα	*Lotus longisiliquosus*	NI	NI	12±2	34±1*	72±2*	92±2*	68	0,943	NI	12±1	33±2*	74±2*	84±3*	84±3*	30	0,976
Πόα	*Tetragonolobus purpureus*	NI	NI	9±1	30±2*	58±5*	88±2*	85	0,953	6±3	11±4	34±2*	73±3*	94±3*	99±1*	30	0,976
Καρποί	*Lotus edulis*	NI	NI	7±1	21±2*	40±3*	74±4*	130	0,947	NI	NI	10±3	49±5*	71±2*	81±2*	51	0,977
Καρποί	*Vicia tenuifolia* subsp. *stenophylla*	NI	NI	7±3	20±2*	37±4*	65±2*	140	0,985	NI	8±3	14±3	38±3*	63±3*	80±3*	69	0,958
Πόα	*Vicia tenuifolia* subsp. *stenophylla*	NI	NI	7±2	14±3	36±5*	60±4*	157	0,972	NI	6±2	15±4	43±3*	67±5*	84±6*	60	0,950
Καρποί	*Tetragonolobus purpureus*	NI	NI	NI	8±2	24±1*	48±4*	>200	0,841	NI	NI	NI	16±2	39±3*	67±3*	135	0,976
Σπέρματα	*Lupinus albus*	NI	NI	7±3	10±3	13±2	16±1*	>200	0,968	Καμία δράση						-	-
Σπέρματα	*Lens culinaris*	Δεν δοκιμάστηκε$^{\zeta}$						-	-	NI	NI	9±4	31±3*	49±2*	73±1*	110	0,897
Σπέρματα	*Phaseolus vulgaris*	Δεν δοκιμάστηκε						-	-	NI	NI	4±1	7±3	10±2	18±2*	>200	0,904
Πόα	*Lupinus albus*	Δεν δοκιμάστηκε						-	-	NI	NI	NI	14±6	17±4	26±4*	>200	0,757
Πόα	*Lathyrus clymenum*	-	-	-	-	-	-	-	-	Καμία δράση						-	-
	Ελαιοευρωπαΐνη$^{\eta}$	36±3*	57±4*	75±1*	93±1*	95±1*	95±1*	8	0,947								

$^{\alpha}$Ποσοστό αναστολής της επαγόμενης από τις ρίζες ROO$^{\bullet}$ μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική.
$^{\beta}IC_{50}$: (μg/mL).
$^{\gamma}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$.
$^{\delta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του ποσοστού αναστολής τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.
$^{\varepsilon}$Τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία δράση σε καμία εξεταζόμενη συγκέντρωση.
$^{\zeta}$Τα εκχυλίσματα δεν δοκιμάστηκαν λόγω της διάλυσής τους σε ποσοστό μεθανόλης που επηρεάζει τα αποτελέσματα.
$^{\eta}$Ελαιοευρωπαΐνη: χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισχυρής προστατευτικής δράσης.
NI: 0% αναστολή. *Στατιστικά σημαντικό ποσοστό, $p<0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ρίζες ROO$^{\bullet}$).



Εικόνα 37: Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων ψυχανθών απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες $ROO^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. (**A**) Μεθανολικά εκχυλίσματα των καρπών (εκχ. **1**) και των υπέργειων τμημάτων (εκχ. **2**) του φυτού *Lotus edulis*. (**B**) Υδατικά εκχυλίσματα των σπερμάτων (εκχ. **3**) και των υπέργειων τμημάτων (εκχ. **4**) του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας, στήλη 2: θετικός μάρτυρας (μόνο ρίζες $ROO^{\bullet}$), στήλες 3-8: ρίζες $ROO^{\bullet}$ και τα εκχυλίσματα **1** ή **2** σε 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL αντίστοιχα, στήλες 9-14: ρίζες $ROO^{\bullet}$ και τα εκχυλίσματα **3** ή **4** σε 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL αντίστοιχα. ΑΚ: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Υπ.: Υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Συνολικά, παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Ωστόσο, η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων διέφερε μεταξύ τους και απέναντι στη δράση των δύο ριζών (Πίνακες 12, 13). Η ιδιότητα αυτή των εκχυλισμάτων υποδεικνύει ότι στα εκχυλίσματα υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να εμποδίζουν τη δράση τους. Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική ποσοτική και ποιοτική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Τέλος, όμοια με τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας, τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (Πίνακες 12, 13).

3.1.4. Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στη δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και προστατεύουν το DNA από την επιβλαβή δράση ελεύθερων ριζών. Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων μελετήθηκε η επίδρασή τους στη δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της XO, της CAT και της SOD.

Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των 17 υδατικών και 17 μεθανολικών εκχυλισμάτων, που δοκιμάστηκαν ανέστειλαν τη δραστικότητα της XO. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 280 με 850 μg/mL και από 200 με 1100 μg/mL για τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα αντίστοιχα. Μόνο 2 μεθανολικά και 4 υδατικά εκχυλίσματα δεν είχαν καμία επίδραση στη δραστικότητα της XO (Πίνακες 14, 15).

Όσον αφορά το ένζυμο CAT, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων δεν εμφάνισαν καμία επίδραση στη δραστικότητά της (Πίνακες 14, 15). Μόνο 5 από τα συνολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστικότητα της CAT. Τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* είχαν την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση με τιμές IC_{50} 120 και 200 μg/mL για το υδατικό και μεθανολικό εκχύλισμα αντίστοιχα. Η δράση των εκχυλισμάτων διέφερε ανάμεσα στα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα. Για παράδειγμα ενώ το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis* είχε ανασταλτική δράση, έχοντας τιμή IC_{50} 490 μg/mL, το αντίστοιχο μεθανολικό εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση στην CAT. Πέντε ακόμη εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστικότητα της CAT, ωστόσο ήταν αδύνατο να προσδιοριστούν οι τιμές IC_{50} γιατί απορροφούσαν στα 240 nm και επηρέαζαν τις μετρήσεις (Πίνακες 14, 15).

Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων δεν επηρέαζε τη δραστικότητα της SOD (Πίνακες 14, 15). Μόνο 6 από τα εκχυλίσματα είχαν επαγωγική δράση στο ένζυμο. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις PC_{50} ήταν μεγαλύτερες από 1 mg/mL. Μόνο 2 εκχυλίσματα, το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus sativus* και το υδατικό εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Tetragonolobus purpureus* είχαν επαγωγική δράση στη δραστικότητα της SOD χωρίς να αναστέλλουν την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης. Τα υπόλοιπα τέσσερα δραστικά εκχυλίσματα είχαν επαγωγική δράση στη δραστικότητα της SOD, ωστόσο ανέστειλαν και σε μικρό ποσοστό την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης (Πίνακες 14, 15).

Πίνακας 14: Επιδράσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα των ενζύμων XO, CAT και SOD

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	Τμήματα των φυτών	Μεθανολικά εκχυλίσματα: Αναστολή XO IC_{50}^{α}	Αναστολή XO TPC στο IC_{50}^{β}	Αναστολή CAT IC_{50}^{α}	Αναστολή CAT TPC στο IC_{50}^{β}	Επαγωγή SOD PC_{50}^{α}	Επαγωγή SOD TPC στο PC_{50}^{β}	Αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης % Αναστολή
Lupinus albus	Περικάρπιο	200 ± 27	13	NA$^{\gamma}$	-	NA	-	-
Lupinus albus	Πόα	210 ± 27	13	NA	-	NA	-	-
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα	380 ± 6	34	200 ± 1	18	1030 ± 23†	92	22*
Lotus edulis	Πόα	410 ± 32	14	NA	-	1500 ± 31†	50	15*
Lens culinaris	Πόα	430 ± 31	7	NA	-	NA	-	-
Lens culinaris	Σπέρματα	440 ± 23	3	NA	-	NA	-	-
Phaseolus vulgaris	Πόα	500 ± 2	9	NA	-	NA	-	-
Vicia faba	Πόα	540 ± 6	16	490 ± 6	15	NA	-	-
Lupinus albus	Σπέρματα	560 ± 9	23	NA	-	NA	-	-
Lathyrus sativus	Πόα	600 ± 3	19	NA	-	1320 ± 27	42	-
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	790 ± 5	2	>500‡	>2	NA	-	-
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	900 ± 2	8	NA	-	NA	-	-
Tetragonolobus purpureus	Πόα	910 ± 9	12	NA	-	NA	-	-
Lotus longisiliquosus	Πόα	1000 ± 9	11	>500‡	>6	NA	-	-
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	1100 ± 14	6	NA	-	NA	-	-
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	NA	-	NA	-	NA	-	-
Lotus edulis	Καρποί	NA	-	>500‡	>4	NA	-	-
Lathyrus clymenum	Πόα	-	-	-	-	-	-	-

	XO IC_{50} (μM)	CAT IC_{50} (μM)
Αλλοπουρινόλη	2,1 ± 0,3	-
Αζίδιο του νατρίου	-	0,35 ± 0,01

$^{\alpha}$Συγκέντρωση (μg/mL) των εκχυλισμάτων που προκαλεί 50% αναστολή (IC_{50}) ή επαγωγή (PC_{50}) της ενζυμικής δραστικότητας ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές για $p<0,05$. $^{\beta}$μg πολυφαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση IC_{50}/PC_{50}. $^{\gamma}$NA: Καμία επίδραση στη δραστικότητα των ενζύμων στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

†Εκχυλίσματα τα οποία αναστέλλουν την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD.

‡Εκχυλίσματα που απορροφούν στα εξεταζόμενα μήκη κύμματος και επηρεάζουν τα αποτελέσματα μετά από τη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

*Στατιστικά σημαντικό ποσοστό αναστολής της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης στις συγκεντρώσεις PC_{50} σε σύγκριση με το μάρτυρα, $p<0,05$.

Πίνακας 15: Επιδράσεις των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα των ενζύμων XO, CAT και SOD

Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*	Τμήματα των φυτών	Υδατικά εκχυλίσματα: Αναστολή XO IC_{50}^{α}	Αναστολή XO TPC στο IC_{50}^{β}	Αναστολή CAT IC_{50}^{α}	Αναστολή CAT TPC στο IC_{50}^{β}	Επαγωγή SOD PC_{50}^{α}	Επαγωγή SOD TPC στο PC_{50}^{β}	Αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης % Αναστολή
Vicia faba	Πόα	280 ± 3	9	480 ± 23	15	NA[γ]	-	-
Phaseolus vulgaris	Πόα	350 ± 6	35	>200‡	>6	NA	-	-
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα	350 ± 9	10	120 ± 3	12	1010 ± 12	101	-
Lupinus albus	Πόα	375 ± 2	15	>500‡	>20	1120 ± 35†	44	17*
Lotus longisiliquosus	Πόα	425 ± 3	11	NA	-	NA	-	-
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Πόα	460 ± 20	7	NA	-	NA	-	-
Lotus edulis	Πόα	550 ± 9	12	450 ± 3	10	NA	-	-
Lens culinaris	Πόα	585 ± 7	29	NA	-	NA	-	-
Tetragonolobus purpureus	Σπέρματα	620 ± 6	8	NA	-	1300 ± 23	17	-
Lotus edulis	Σπέρματα	670 ± 10	9	NA	-	NA	-	-
Tetragonolobus purpureus	Πόα	685 ± 6	14	NA	-	NA	-	-
Lupinus albus	Περικάρπιο	790 ± 18	22	NA	-	NA	-	-
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	850 ± 3	10	NA	-	NA	-	-
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	NA	-	NA	-	NA	-	-
Lens culinaris	Καρποί	NA	-	NA	-	NA	-	-
Lupinus albus	Καρποί	NA	-	NA	-	NA	-	-
Lathyrus clymenum	Πόα	NA	-	NA	-	NA	-	-
Lathyrus sativus	Πόα	-	-	-	-	-	-	-

	XO IC_{50} (μM)	CAT IC_{50} (μM)
Αλλοπουρινόλη	2,1 ± 0,3	-
Αζίδιο του νατρίου	-	0,35 ± 0,01

[α]Συγκέντρωση (μg/mL) των εκχυλισμάτων που προκαλεί 50% αναστολή (IC_{50}) ή επαγωγή (PC_{50}) της ενζυμικής δραστικότητας ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές για $p<0,05$. [β]μg πολυφαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση IC_{50}/PC_{50}. [γ]NA: Καμία επίδραση στη δραστικότητα των ενζύμων στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

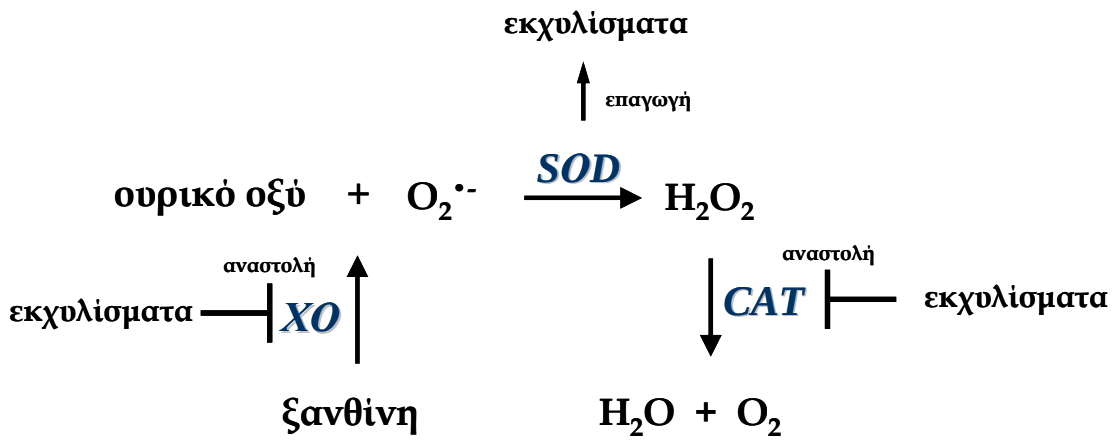
†Εκχυλίσματα τα οποία αναστέλλουν την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD.

‡Εκχυλίσματα που απορροφούν στα εξεταζόμενα μήκη κύμματος και επηρεάζουν τα αποτελέσματα μετά από τη συγκεκριμένη συγκέντρωση. *Στατιστικά σημαντικό ποσοστό αναστολής της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης στις συγκεντρώσεις PC_{50} σε σύγκριση με το μάρτυρα, $p<0,05$.

Αυτό οφείλεται στο ότι ενώσεις στα εκχυλίσματα έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ που βρίσκονται στον αέρα και οδηγούν στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης (Πίνακες 14, 15). Τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, τα οποία ανέστειλαν σε μικρό βαθμό την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης, είχαν παρουσιάσει και ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Πίνακας 11).

Συνολικά, παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστικότητα της ΧΟ και της CAT ενώ είχαν επαγωγική δράση στη δραστικότητα της SOD (Πίνακες 14, 15 Εικόνα 38). Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Στην πλειοψηφία τους τα εκχυλίσματα που είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις στις συγκεντρώσεις IC_{50} παρουσίασαν και ισχυρότερη ανασταλτική δράση στη δραστικότητα της ΧΟ και της CAT. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παίζει σημαντικό ρόλο και η ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων (Πίνακες 14, 15).

Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην ΧΟ ήταν πιο ισχυρή σε σχέση με την επίδρασή τους στα άλλα δύο ένζυμα, καθώς τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την ΧΟ σε συγκεντρώσεις στις οποίες δεν είχαν καμία δράση στην CAT και την SOD. Τα μόνα εκχύλισματα που επηρέαζαν τη δραστικότητα και των τριών ενζύμων ήταν το υδατικό και μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*. Τα εκχυλίσματα αυτά ήταν τα μόνα τα οποία ήταν πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της δραστικότητας της CAT από ότι της ΧΟ (Πίνακες 14, 15). Με βάση τις αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα που εξετάστηκαν, παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά στο να εμποδίζουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών από την ΧΟ, παρά στην εξουδετέρωσή τους μέσω της δράσης της CAT και της SOD (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης των εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα των ενζύμων XO, CAT και SOD.

3.1.5. Επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στη δράση της τοποϊσομεράσης I

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εξετάστηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στη δράση της τοποϊσομεράσης I. Η τοποϊσομεράση I προκαλώντας μονόκλωνα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA χαλαρώνει την υπερελικωμένη διαμόρφωσή του σε ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

Από τα συνολικά εκχυλίσματα ψυχανθών, εξετάστηκαν αρχικά 11 υδατικά εκχυλίσματα για την επίδρασή τους στη δράση της τοποϊσομεράσης I (Πίνακας 16). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο δύο εκχυλίσματα επηρέασαν τη δράση της τοποϊσομεράσης I στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (100-800 μg/mL). Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από τα υπέργεια τμήματα των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Vicia faba* (Πίνακας 16). Το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ήταν το πιο δραστικό εκχύλισμα καθώς παρουσίασε ανασταλτική δράση απέναντι στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα, παρουσιάζοντας 55% αναστολή στη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 100 μg/mL (Πίνακας 16). Η δράση του εκχυλίσματος αυτού εξετάστηκε και σε μικρότερες συγκεντρώσεις 5, 20 και 50 μg/mL παρουσιάζοντας 23% αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I στη συγκέντρωση 20 μg/mL (Εικόνα 39).

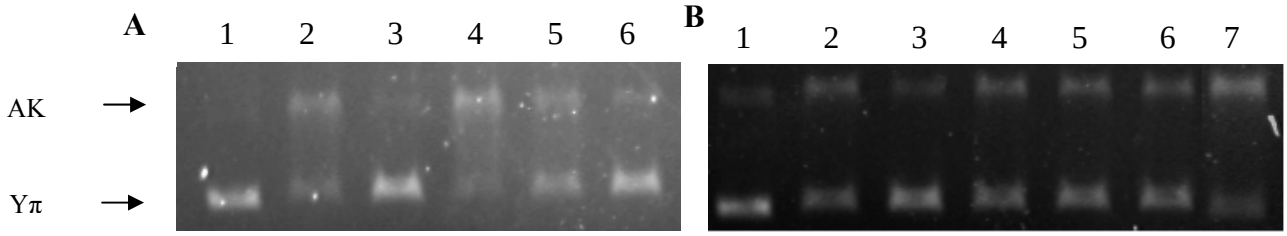
Το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba* παρουσίασε ανασταλτική δράση στην τοποϊσομεράση I στις συγκεντρώσεις 200 και 400 μg/mL. Ωστόσο, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 800 μg/mL, εμφάνισε επαγωγική δράση. Σε αυτή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, παρουσία της τοποϊσομεράσης I, η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA μετέβηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (Εικόνα 39).

Πίνακας 16: Επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι

Ψυχανθή	Τμήματα των φυτών	Συγκεντρώσεις (μg/mL) 5	20	50	100	200	400	800
		% Αναστολή						
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	Πόα	7±2	23±2[*α]	49±1[*]	55±4[*]	57±3[*]	60±4[*]	64±4[*]

Ψυχανθή	Τμήματα των φυτών	Συγκεντρώσεις (μg/mL) 100	200	400	800
		% Αναστολή			% Επαγωγή
Vicia faba	Πόα	11±2	15±2[*]	32±4[*]	-74±8[*]
Lotus edulis	Πόα	καμία δράση[β]			
Lotus edulis	Σπέρματα	καμία δράση			
Phaseolus vulgaris	Σπέρματα	καμία δράση			
Phaseolus vulgaris	Πόα	καμία δράση			
Lens culinaris	Πόα	καμία δράση			
Lens culinaris	Σπέρματα	καμία δράση			
Lupinus albus	Σπέρματα	καμία δράση			
Lupinus albus	Πόα	καμία δράση			
Lathyrus clymenum	Πόα	καμία δράση			

[α]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. [β]Τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία δράση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. [*]Στατιστικά σημαντικό ποσοστό για $p<0,05$.



Εικόνα 39: Επίδραση των δραστικών υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι. (**Α**) Εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και (**Β**) του φυτού *Vicia faba*. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας. Στήλη 2: θετικός μάρτυρας. Πλασμιδιακό DNA το οποίο μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία 1,3 units Topo I μόνο (θετικός μάρτυρας), Στήλη 3: πλασμιδιακό DNA, 1,3 units Topo I παρουσία 200 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος σταφυλιού ή 5, 20 και 50 μg/mL εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (στήλες 4-6 **Α**) ή με 100, 200, 400 και 800 μg/mL εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* (στήλες 4-7 **Β**). ΑΚ: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Υπ.: Υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών που δοκιμάστηκαν δεν επηρέαζαν τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι. Έτσι, δοκιμάστηκαν μόνο τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Vicia faba*. Ακόμη, εξετάστηκε και το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*, παρόλο που το αντίστοιχο υδατικό εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση στην τοποϊσομεράση Ι.

Και τα τρία μεθανολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακας 17). Πιο αναλυτικά, το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν το πιο δραστικό καθώς παρουσίασε ανασταλτική δράση από τη συγκέντρωση 20 μg/mL. Το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba*, σε αντίθεση με το αντίστοιχο υδατικό εκχύλισμα, ανέστειλε την τοποϊσομεράση Ι μόνο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 800 μg/mL. Ακόμη, σε αντίθεση με το αντίστοιχο υδατικό εκχύλισμα, το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis* παρουσίασε ανασταλτική δράση στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι στις συγκεντρώσεις 400 και 800 μg/mL (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, *Vicia faba* και *Lotus edulis* στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι

Μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών				
	Συγκεντρώσεις (μg/mL)			
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	**5**	**20**	**50**	**100**
	% Αναστολή			
	9±4	17±3*	32±2*	53±0,5*
	Συγκεντρώσεις (μg/mL)			
	100	**200**	**400**	**800**
	% Αναστολή			
Vicia faba	NI	NI	NI	21±1*
Lotus edulis	NI	14±4	20±2*	24±2*

[α]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. NI: 0% αναστολή. *Στατιστικά σημαντικό ποσοστό για $p<0,05$.

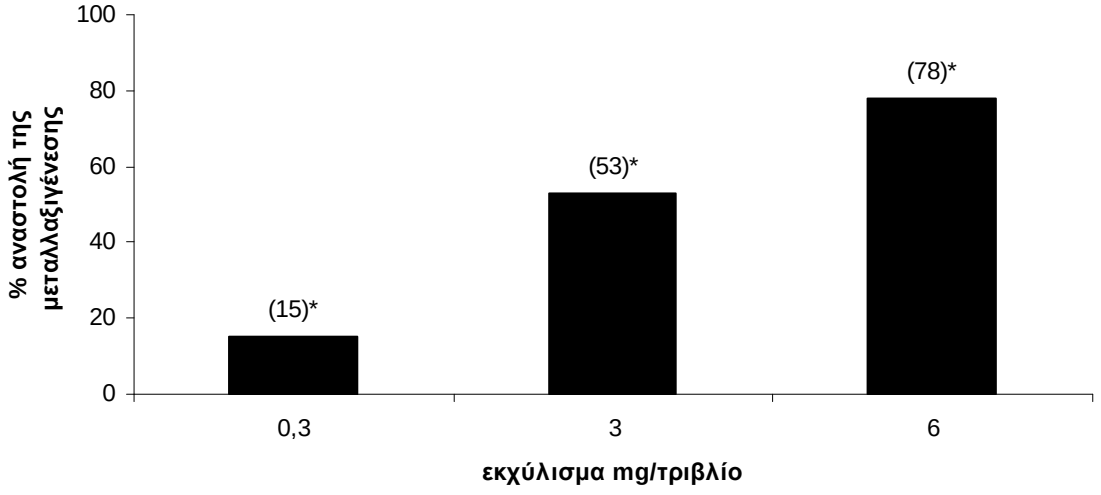
Συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι στα εκχυλίσματα των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, *Vicia faba* και *Lotus edulis* υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την τοποϊσομεράση Ι και να επηρεάζουν την δράση της. Τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται στη δράση των εκχυλισμάτων οφείλονται στο ότι τα εκχυλίσματα των τριών αυτών ψυχανθών προέρχονται από διαφορετικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση σε δραστικές ουσίες, η οποία επηρεάζεται και από τον διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης. Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στις περισσότερες συγκεντρώσεις ανασταλτική δράση. Στις συγκεντρώσεις αυτές μπορεί να θεωρηθούν ως καταστολείς της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι. Αντίθετα, το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση 800

μg/mL παρουσίασε επαγωγική δράση στην τοποϊσομεράση Ι, υποδεικνύει έναν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με το ένζυμο.

3.1.6. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών εκχυλισμάτων

Για τη μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης επιλέχθηκαν τα εκχυλίσματα που είχαν κάποια επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης Ι. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Vicia faba* και το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*. Τα εκχυλίσματα αυτά, μελετήθηκαν για την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε βακτηριακά κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα δεν έδειξαν ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

Μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασε αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, ανέστειλε την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε ποσοστό 15%, 53% και 78% στις συγκεντρώσεις 0,15, 1,5 και 3 mg/mL (0,3, 3, 6 mg/τριβλίο) αντίστοιχα (Πίνακας 18, Γράφημα 4). Και τα δύο εκχυλίσματα του φυτού *Vicia faba* και το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* δεν παρουσίασαν καμία αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Ακόμη, κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε τοξικότητα στα κύτταρα όταν δοκιμάστηκαν μόνα τους στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (6 mg/τριβλίο = 3 mg/mL) (Πίνακας 18).



Γράφημα 4: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*.

Πίνακας 18: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων υπέργειων τμημάτων των ψυχανθών

	Υδατικά εκχυλίσματα				**Μεθανολικά εκχυλίσματα**					
	Lathyrus laxiflorus		***Vicia faba***		***Lathyrus laxiflorus***		***Vicia faba***		***Lotus edulis***	
	N^o His$^+$ αποικίες /τριβλίο$^\alpha$	**N^o επαγόμενων αποικιών /τριβλίο$^\beta$**	**N^o His$^+$ αποικίες /τριβλίο**	**N^o επαγόμενων αποικιών /τριβλίο**	**N^o His$^+$ αποικίες /τριβλίο**	**N^o επαγόμενων αποικιών /τριβλίο**	**N^o His$^+$ αποικίες /τριβλίο**	**N^o επαγόμενων αποικιών /τριβλίο**	**N^o His$^+$ αποικίες /τριβλίο**	**N^o επαγόμενων αποικιών /τριβλίο**
Αρνητικός μάρτυρας	275 ± 16	-	278 ± 10	-	271 ± 7	-	236 ± 21	-	272 ± 14	-
Θετικός μάρτυρας (+Μπλ.)$^\gamma$	1027 ± 13**	752**	838 ± 28**	560**	1026 ± 45**	755**	818 ± 11**	582**	876 ± 26**	604**
Εκχ. 0,3 mg/τριβλίο$^\delta$ (+Μπλ.)	986 ± 41	711	809 ± 22	532	912 ± 30*	641*	804 ± 16	569	811 ± 17	539
Εκχ. 3 mg/τριβλίο (+Μπλ.)	1027 ± 37	752	785 ± 48	507	623 ± 25*	352*	843 ± 8	607	808 ± 32	536
Εκχ. 6 mg/τριβλίο (+Μπλ.)	1035 ± 58	760	798 ± 49	520	434 ± 20*	163*	806 ± 37	570	816 ± 16	541
Εκχ. 6 mg/τριβλίο (-Μπλ.)	308 ± 28	-	272 ± 11	-	240 ± 25	-	272 ± 11	-	257± 6	-
Μεθ. εκχ. σταφύλι 6 mg/τριβλίο (+Μπλ.)$^\varepsilon$	551 ± 26*	236*	441 ± 26*	164*	479 ± 20*	208*	411 ± 14*	175*	387± 26*	115*

$^\alpha$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα του αριθμού (N^o) των επαναμεταλλαγμένων His$^+$ αποικιών/τριβλίο.
$^\beta$Αριθμός (N^o) των επαγόμενων αποικιών/τριβλίο: υπολογίζεται αφαιρώντας τη μέση τιμή του αριθμού των αυθόρμητων His$^+$ αποικιών του αρνητικού μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το εκχύλισμα.
$^\gamma$(+Μπλ.): Παρουσία μπλεομυκίνης 0,5 μg/τριβλίο.
$^\delta$Συγκέντρωση εκχυλίσματος mg/mL= (mg/τριβλίο)/2.
$^\varepsilon$Το μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιού χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισχυρής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης (70% αναστολή της μεταλλαξιγένεσης).
*Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα, $p<0,05$.
**Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, $p<0,05$.

3.2. Βιοδραστικά πολυφαινολικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων και βιολογικές τους ιδιότητες

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι παρατηρούμενες δράσεις των εκχυλισμάτων αποδίδονται στα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά τους. Με σκοπό την ταυτοποίηση και μελέτη των ιδιοτήτων των συστατικών αυτών επιλέχθηκαν δύο μεθανολικά εκχυλίσματα που παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες με βάση τις παραπάνω μεθόδους. Τα εκχυλίσματα που επιλέχθηκαν ήταν τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* (κουκιά) και *Lotus edulis* (λώτος). Ακολούθησε κλασματοποίηση των εκχυλισμάτων καθώς και απομόνωση και ταυτοποίηση κάποιων πολυφαινολικών ενώσεων των κλασμάτων που απομονώθηκαν.

3.2.1. Βιοδραστικά πολυφαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων

Από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba* (48,1 g) μετά τη διαδικασία κλασματοποίησης απομονώθηκαν συνολικά 16 κλάσματα (11, Vf A-L και 5 Vf M-Q), ενώ από εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (12 g) συνολικά 15 κλάσματα (9 Le A-I και 6 Le K-P). Από αυτά τα κλάσματα, επιλέχθηκαν 10 από το εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και 4 από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* για περαιτέρω μελέτη των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων. Η σύσταση των κλασμάτων και η αναλογία των ενώσεων σε αυτά παρουσιάζεται στον Πίνακα 19.

Τα κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* ήταν μείγματα 2-3 πολυφαινολικών ενώσεων σε διαφορετική αναλογία. Αντίθετα τα κλάσματα που του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis* ήταν μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις, με εξαίρεση το κλάσμα Le E, το οποίο ήταν μείγμα δύο ισομερών της ίδιας ένωσης σε ίση αναλογία (Πίνακας 19). Στα κλάσματα αυτά ταυτοποιήθηκαν συνολικά 14 πολυφαινολικές ενώσεις. Ο περαιτέρω καθαρισμός των ουσιών έγινε με τη χρήση HPLC ενώ η δομή τους προσδιορίστηκε με τις τεχνικές φασματοσκοπίας 1D και 2D NMR, υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και φασματομετρία μάζας MS. Στις μελέτες NMR έγιναν πειράματα συντονισμού πρωτονίου (^{1}H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR) μιας και δύο διαστάσεων, με διαφορετικές αλληλουχίες παλμών (DEPT, NOESY κλπ) προκειμένου να καθορισθεί πλήρως τόσο η δομή, όσο και η στερεοχημεία του κάθε προϊόντος.

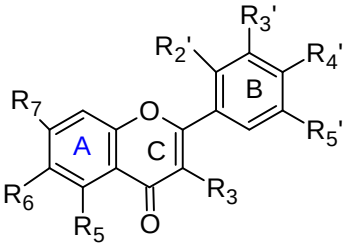
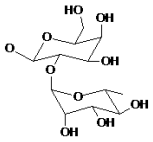
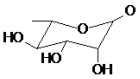
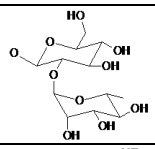
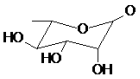
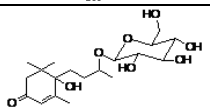
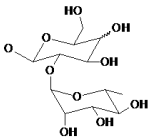
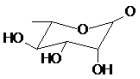
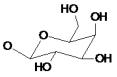
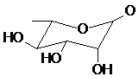
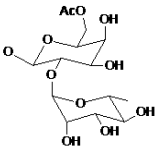
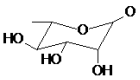
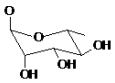
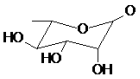
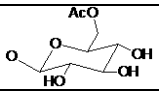
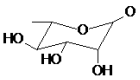
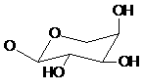
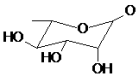
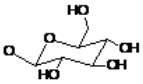
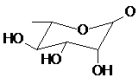
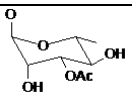
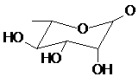
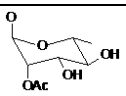
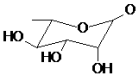
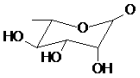
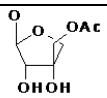
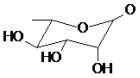
Πίνακας 19: Κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* και η σύσταση τους σε πολυφαινολικές ενώσεις

Κλάσματα από το εκχύλισμα φυτού *Vicia faba*	**Πολυφαινολικές ενώσεις**	**Αναλογία ενώσεων**	**Ποσότητα (mg)**
Vf B	1:2:3[α]	3:1:3	320
Vf C	1:2	2:1	320
Vf E	3:4	3:1	235
Vf F	3:4	2:1	438
Vf I	5:6	1:4	305
Vf K	5:10:6	4:1:2	245
Vf L	Μίγμα μη πολικών ενώσεων	-	1123
Vf N	7:8	2:1	291
Vf P	9:10	1:1	800
Vf Q	5:10	2:3	841
Κλάσματα από το εκχύλισμα φυτού *Lotus edulis*	**Πολυφαινολικές ενώσεις**	**Αναλογία ενώσεων**	**Ποσότητα (mg)**
Le B	13	1	92
Le E	11 a,b (ισομερή)	1: 1	42
Le N	7	1	94
Le O	12	1	46

[α]Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα.

Οι ενώσεις **1-11** ήταν γνωστές σε αντίθεση με τις ενώσεις **12** και **13** οι οποίες δεν είχαν ταυτοποιηθεί ξανά (Andersen & Markham, 2006). Η ταυτοποίηση των ενώσεων **12** και **13** πραγματοποιήθηκε μέσω 1D (^{1}H, ^{13}C, DEPT) και 2D (COSY, HMBC, HMQC) NMR και MS. Οι 13 ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν γλυκοσίδια φλαβονολών και πιο συγκεκριμένα μονο-, δι- και τρισακχαριδικά παράγωγα της καιμπφερόλης και της κερκετίνης. Πιο αναλυτικά ταυτοποιήθηκαν 10 γλυκοσίδια καιμπφερόλης και 3 της κερκετίνης. Μόνο μία ένωση, η ένωση **3**, δεν ήταν φλαβονοειδές. Με βάση την βασική χημική δομή των φλαβονοειδών τα σάκχαρα είναι συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες του άνθρακα C-7 του A δακτυλίου της δομής των φλαβονοειδών και του άνθρακα C-3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου (C) (Πίνακας 20). Οι πλήρεις ονομασίες και τα μοριακά βάρη των πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα βρίσκονται στο Παράρτημα (Πίνακας 33).

Πίνακας 20: Χημική δομή των πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*

Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών								
Ενώσεις	**R_3**	**R_5**	**R_6**	**R_7**	**$R_{2'}$**	**$R_{3'}$**	**$R_{4'}$**	**$R_{5'}$**
κερκετίνη	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
καιμπφερόλη	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
1		OH	H		H	OH	OH	H
2		OH	H		H	OH	OH	H
3		**(μη φλαβονοειδές)**						
4 (μείγμα ισομερών)		OH	H		H	H	OH	H
5		OH	H		H	H	OH	H
6		OH	H		H	OH	OH	H
7		OH	H		H	H	OH	H
8		OH	H		H	H	OH	H
9		OH	H		H	H	OH	H
10		OH	H		H	H	OH	H
11(a)		OH	H		H	H	OH	H
11(b)		OH	H		H	H	OH	H
12		OH	H		H	H	OH	H
13		OH	H		H	H	OH	H

Τα δεδομένα των φασμάτων NMR που αφορούν την ταυτοποίηση των ενώσεων **12** και **13** παρουσιάζονται στον Πίνακα 21. Το φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης **12** έδειξε A και B σήματα τυπικά για τα 3,7-δι-ορθο-υποκατεστημένα γλυκοσίδια της καιμπφερόλης. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα έδειξε δύο ζευγάρια διπλών κορυφών, ένα στο *δ* 7,90 (2H, d, J=8,2 Hz), που αντιπροσώπευε το H-2΄ και H-6΄ και το δεύτερο στο *δ* 6,94 (2H, d, J=8,2 Hz), που αντιπροσώπευε τα H-3΄ και H-5΄. Τα δύο πρωτόνια έδωσαν σήμα στα *δ* 6,73 και 6,46 (br s) και αντιστοιχούσαν στους άνθρακες C-8 και C-6 αντίστοιχα. Αυτή η χημική μετατόπιση επιβεβαίωσε ότι ο άνθρακας C-7 είναι υποκατεστημένος στο δακτύλιο A της ένωσης. Η παρουσία των δύο ανωμερών πρωτονίων στα *δ* 5,73 (br s) και 5,57 (br s) έδειξε ότι τα δύο σάκχαρα είναι ενωμένα στο μη γλυκοσιδικό τμήμα. Το πρώτο από αυτά αντιστοιχεί στο β-D-απιοφουρανόσυλο τμήμα, όπως έδειξε η διαφορά στην χημική μετατόπιση στα 2,9 ppm για τους άνθρακες C-2΄΄ και C-3΄΄. Το δεύτερο σήμα και η μεθυλομάδα στο *δ* 1,29 (d, J=6,4 Hz) απέδειξε την παρουσία μίας ομάδας ραμνόζης, που είναι δεσμευμένη στο μη γλυκοσιδικό τμήμα μέσω α-ένωσης (Ibrahim et al., 2008).

Το φάσμα ^{13}C NMR και τα πειράματα DEPT της ένωσης **12** έδειξαν την παρουσία δύο μεθυλενίων, ενός μεθυλίου, 13 μεθυνίων και 10 τετραεδρικών ανθράκων. Δεκαπέντε από αυτά τα σήματα αντιστοιχούσαν στην καιμπφερόλη, δηλαδή στο μη γλυκοσίδιο, 6 στην ομάδα της ραμνόζης και 5 στην ομάδα της απιόζης. Η χημική μετατόπιση του C-4 (*δ* 179,5) απέδειξε την παρουσία υδροξυλίου στον C-5 με χηλικές ιδιότητες, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την χημική μετατόπιση του C-5 (*δ* 162,6). Στο φάσμα HMBC ήταν εμφανής η συσχέτιση μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου του τμήματος του ραμνοπυρανοσυλίου (H-1΄΄, *δ* 5,57) και του C-7 (*δ* 163,5), παρότι το ανωμερικό πρωτόνιο του απιοσυλίου (H-1΄΄, *δ* 5,73) έδειξε να συσχετίζεται με τον C-3 (*δ* 135,2). Η αντιστοιχία των διαφόρων πρωτονίων των σακχάρων έγινε με spin-pattern analysis, COSY και HMQC. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν τη νέα δομή της ένωσης **12** ως 3-ορθο-απιοφουρανοσυλο-7-ορθο-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη.

Τα αποτελέσματα της NMR για την ένωση **13** ήταν παρόμοια με αυτά της ένωσης **12**. Ωστόσο, τα σήματα στα *δ* 2,10 (3H, s) στο φάσμα ^{1}H NMR και στα *δ* 20,7 και 172,6 στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **13** απέδειξε την παρουσία μίας ακετυλομάδας. Η ομάδα αυτή συνδεόταν στον άνθρακα C-5΄΄ βάσει της παρατηρούμενης υψηλής μετατόπισης του H-5΄΄ (*δ* 4,18 και 4,06 αντί για *δ* 4,14 και 3,89 για την ένωση **12**). Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας (ESMS) για την ένωση **12 (**m/z 565 $[M+H]^+$) και για την ένωση **13** (m/z 607 $[M+H]^+$) οδήγησαν στον καθορισμό των μοριακών τύπων $C_{26}H_{28}O_{14}$ και $C_{28}H_{30}O_{15}$, αντίστοιχα.

Πίνακας 21: Δεδομένα φασμάτων NMR των ενώσεων **12** και **13**

Ένωση 12				Ένωση 13			
	^{1}H		^{13}C		^{1}H		^{13}C
C/H	***δ***	**m, *J* (Hz)**	***δ***	**C/H**	***δ***	**m, *J* (Hz)**	***δ***
1	-		-	1	-		-
2	-		159,6	2	-		160,2
3	-		135,2	3	-		135,4
4	-		179,5	4	-		179,7
5	-		162,6	5	-		163,0
6	6,46	br s	99,6	6	6,45	br s	99,9
7	-		163,2	7	-		163,6
8	6,73	br s	95,3	8	6,74	br s	95,7
9	-		157,7	9	-		158,1
10	-		107,1	10	-		107,8
1΄	-		122,3	1΄	-		122,6
2΄	7,90	d, 8,2	131,6	2΄	7,87	d, 8,2	132,1
3΄	6,94	d, 8,2	116,1	3΄	6,94	d, 8,2	116,5
4΄	-		161,3	4΄	-		161,7
5΄	6,94	d, 8,2	116,1	5΄	6,94	d, 8,2	116,5
6΄	7,90	d, 8,2	131,6	6΄	7,87	d, 8,2	132,1
1΄΄	5,73	br s	110,9	1΄΄	5,72	br s	110,9
2΄΄	4,31	br s		2΄΄	4,23	br s	79,5
3΄΄	-		79,2	3΄΄	-		76,6
4΄΄α	3,54	d 12,5	76,4	4΄΄a	3,53	d 12,5	79,2
4΄΄β	3,64	d 12,5		4΄΄b	3,64	d 12,5	
5΄΄α	4,14	d 11,0	69,8	5΄΄α	4,18	d 11,0	67,8
5΄΄β	3,89	d 11,0		5΄΄β	4,06	d 11,0	
1΄΄΄	5,57	br s	100,3	1΄΄΄	5,58	br s	100,6
2΄΄΄	4,06	br s	72,0	2΄΄΄	4,04	br s	71,2
3΄΄΄	3,86	dd 9,5, 1,7	72,5	3΄΄΄	3,85	dd 9,5, 1,7	71,7
4΄΄΄	3,52	t 9,5	73,7	4΄΄΄	3,50	t 9,5	73,6
5΄΄΄	3,64	m	71,7	5΄΄΄	3,64	m	71,7
6΄΄΄	1,29	d, 6,4	17,8	6΄΄΄	1,28	d, 6,5	18,2
				CH_3CO-	2,10	m	20,7
				CH_3CO-	-		172,6

3.2.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών συστατικών

Αρχικά όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH$^{\bullet}$ (Πίκακας 22). Είναι επίσης άξιο αναφοράς το γεγονός ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων ήταν ισχυρότερη από τα αρχικά εκχυλίσματα. Με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r = 0,885-0,994, p<0,01), όλα τα κλάσματα και από τα δύο φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας και της συγκέντρωσής τους (Πίκακας 22).

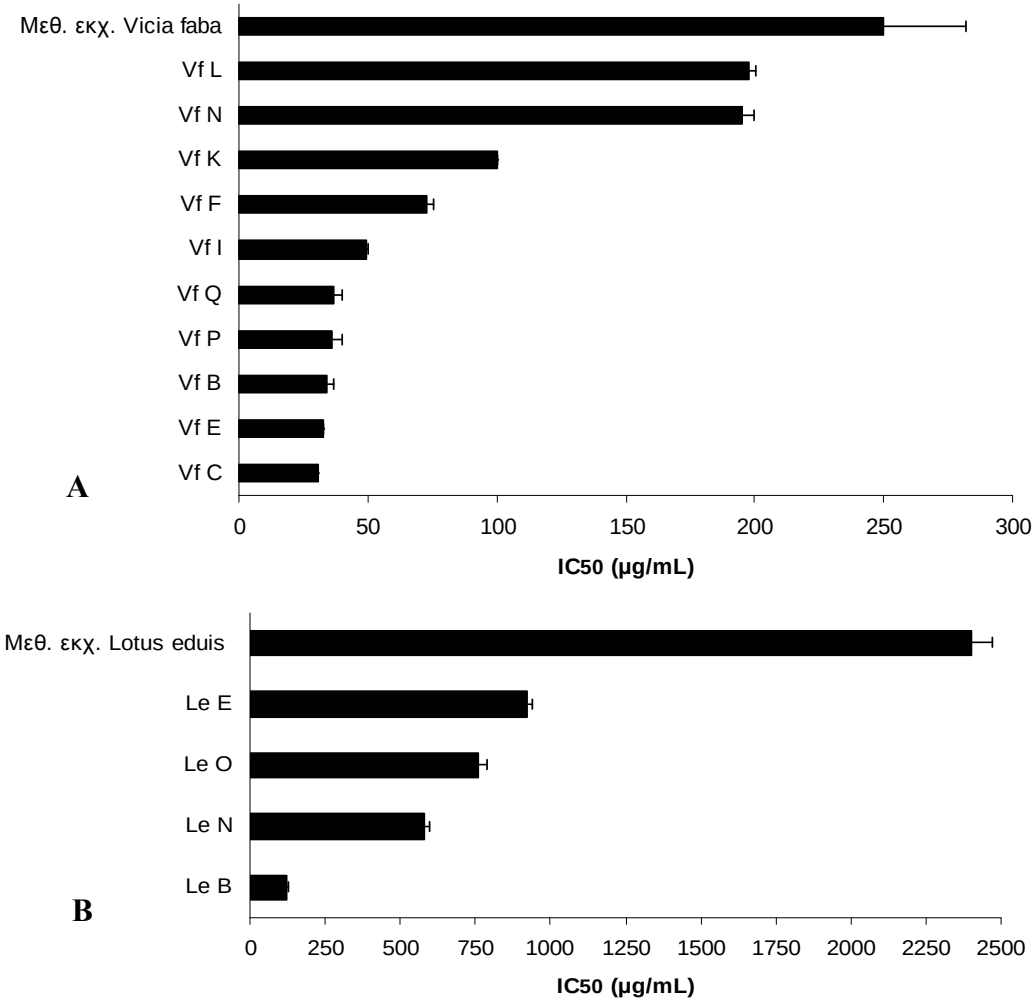
Πιο συγκεκριμένα, όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα που προέκυψαν από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba* ήταν ισχυροί δεσμευτές της ρίζας DPPH$^{\bullet}$. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 31-198 μg/mL. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα πολυφαινολικά κλάσματα Vf C, E, B, P και Q ήταν τα πιο ισχυρά, εξουδετερώνοντας τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ κατά 50% στις συγκεντρώσεις 31-37 μg/mL. Αντίθετα, τα Vf L, N και K ήταν τα λιγότερο ισχυρά κλάσματα (Πίνακας 22, Γράφημα 5A). Οι παρατηρούμενες διαφορές στην ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας μεταξύ των κλασμάτων αποδίδονται στους διαφορετικούς συνδυασμούς των πολυφαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στα κλάσματα και στις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ τους (Πίκακας 19).

Τα καθαρά φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* ήταν επίσης αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση της ρίζας DPPH$^{\bullet}$. Ωστόσο, η δράση τους ήταν λιγότερο ισχυρή σε σχέση με τα πολυφαινολικά κλάσματα από το εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*. Αυτό οφείλεται στο ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* είχε χαμηλότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH$^{\bullet}$ από το εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 120-580 μg/mL (Πίνακας 22). Τα κλάσματα Le O, Le N, Le B και Le E, έδειξαν διαφορετική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH$^{\bullet}$. Το κλάσμα Le B (ένωση **13**) παρουσίασε την πιο ισχυρή δράση ενώ το κλάσμα Le E (ενώσεις **11a, 11b**) τη λιγότερο ισχυρή (Πίνακας 22, Γράφημα 5B).

Πίνακας 22: Ικανότητα των πολυφαινολικών κλασμάτων να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$

Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba*	**IC_{50} (μg/mL)**	**r$^{\alpha}$**	**Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis***	**IC_{50} (μg/mL)**	**r**
Vf C	31 ± 0,5$^{\beta}$	0,978	Le B	120 ± 5	0,965
Vf E	33 ± 0,1	0,980	Le N	580 ± 20	0,969
Vf B	34 ± 2,5	0,964	Le O	760 ± 30	0,969
Vf P	36 ± 4	0,919	Le E	920 ± 20	0,969
Vf Q	37 ± 3	0,964	Μεθ. εκχ. *Lotus edulis*$^{\gamma}$	2400 ± 70	0,891
Vf I	50 ± 0,5	0,956			
Vf F	73 ± 2,5	0,901			
Vf K	100 ± 0,07	0,885			
Vf N	195 ± 5	0,994			
Vf L	198 ± 2,5	0,890			
Μεθ. εκχ. *Vicia faba*$^{\gamma}$	250 ± 30	0,853			

$^{\alpha}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\beta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\gamma}$Αρχικά ολικά μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών από τα οποία προέκυψαν τα κλάσματα.



Γράφημα 5: Ικανότητα των κλασμάτων πολυφαινολικών κλασμάτων να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού (**A**) *Vicia faba* και (**B**) *Lotus edulis*. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα.

Επειδή τα κλάσματα του φυτού *Lotus edulis* αποτελούνται από μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις, είναι εφικτό να συσχετιστούν τα δομικά τους χαρακτηριστικά με τις παρατηρούμενες αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Το Le O (ένωση **12**), το οποίο διαφέρει από το Le B (ένωση **13**) ως προς μία ακετυλομάδα, παρουσίασε μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το Le B. Αντίθετα, το Le N (ένωση **7**), που επίσης διαφέρει κατά μία ακετυλομάδα από το Le E (ενώσεις **11a**, **11b**), παρουσίασε πιο ισχυρή δράση από το Le E. Αυτό αποδίδεται στο ότι στο κλάσμα Le E συνυπάρχουν δύο ενώσεις, ισομερείς μορφές της ένωσης **11** (Πίνακας 22, Γράφημα 5B). Γενικά, η αλληλεπίδραση ενός αντιοξειδωτικού με τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ εξαρτάται από τη στερεοχημική του διαμόρφωση καθώς και από τον αριθμό και τη διαθεσιμότητα των υδροξυλομάδων. Το γεγονός ότι το κλάσμα Le B ήταν πιο ισχυρό από το Le O, υποδεικνύει έναν πιο

περίπλοκο μηχανισμό αλληλεπίδρασης των ενώσεων με τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Επιπλέον, το γεγονός ότι το κλάσμα Vf L ήταν το μοναδικό που αποτελείται από μη πολικά συστατικά μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλή του ικανότητα να εξουδετερώνει τη ρίζα (Πίνακας 22).

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα των δύο εκχυλισμάτων, αποτελούν μερικά από τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων που είναι υπεύθυνα για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων ήταν ισχυρότερη από τα αρχικά εκχυλίσματα. Αυτό δείχνει ότι η υψηλότερη δράση των κλασμάτων οφείλεται στο ότι ο συνδυασμός των πολυφαινολικών ενώσεων μέσα στο εκχύλισμα δρα με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με τις καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις στα κλάσματα. Μία ακόμη αιτία της υψηλής τους δράσης μπορεί να είναι ο εμπλουτισμός των κλασμάτων κατά τη διαδικασία εκχύλισής τους.

3.2.3. Προστατευτική δράση των πολυφαινολικών συστατικών στην επαγόμενη από ρίζες OH$^{\bullet}$ και ROO$^{\bullet}$πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

3.2.3.α. Προστατευτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων

Επειδή όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, εξετάστηκαν επίσης ως προς την ικανότητά τους να αποτρέπουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες καταστροφή του DNA. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να προστατεύουν το DNA απέναντι στη δράση των ριζών ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$. Όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα και των δύο φυτών ήταν επίσης ισχυροί αναστολείς της επαγόμενης από τις ρίζες ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$ μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική (Πίνακας 23). Κανένα από τα πολυφαινολικά κλάσματα δεν επηρέασε μόνο του την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* παρουσίασαν σημαντική δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση ($r>0,88$ με $p<0,01$) απέναντι και στις δύο ρίζες ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} τα κλάσματα είχαν πιο ισχυρή ανασταλτική δράση απέναντι στην επαγόμενη καταστροφή του DNA από τις ρίζες ROO$^{\bullet}$ παρά από τις ρίζες OH$^{\bullet}$, με τις τιμές IC_{50} να κυμαίνονται από 1,9-9,4 μg/mL και από 293-1600 μg/mL, αντίστοιχα. Η

ισχύς της προστατευτικής δράσης των κλασμάτων διαφέρει ανάμεσα στις ρίζες. Χαρακτηριστικά ήταν τα αποτελέσματα των κλασμάτων Vf P, N και B. Συνοπτικά, το κλάσμα Vf P, που ήταν το πιο αποτελεσματικό απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$ δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$. Το κλάσμα Vf B ήταν επίσης αποτελεσματικό απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$ ενώ προκάλεσε αναστολή μόνο κατά 25% σε συγκέντρωση 1600 μg/mL απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$. Σε αντίθεση με τα Vf P και Vf B, το κλάσμα Vf N δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό απέναντι στην ικανότητα των ριζών $ROO^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA ενώ ήταν πιο αποτελεσματικό απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$.

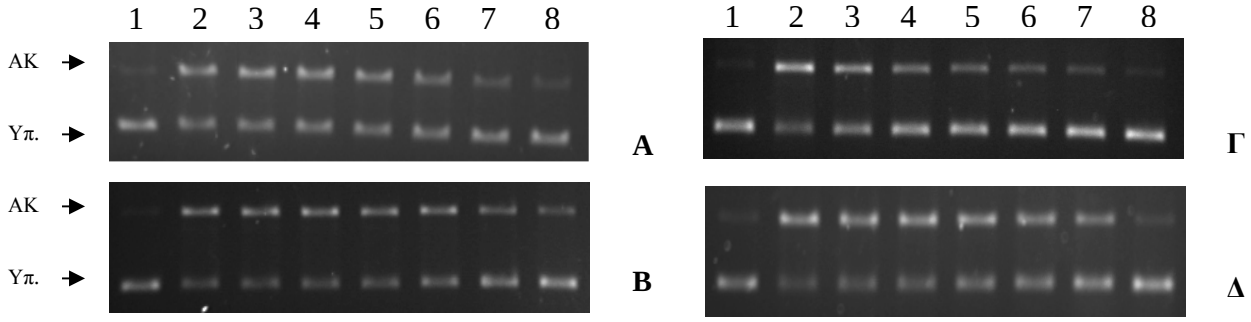
Πίνακας 23: Προστατευτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων στην επαγόμενη από ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba*	**IC_{50} (μg/mL)**		**Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis***	**IC_{50} (μg/mL)$^{\alpha}$**	
	$ROO^{\bullet}$	**$OH^{\bullet}$**		**$ROO^{\bullet}$**	**$OH^{\bullet}$**
Vf P	1,9 ± 0,1$^{\alpha}$	653 ± 55,1	Le B	9,8 ± 0,4	NT$^{\beta}$
Vf C	2,1 ± 0,1	>1600$^{\gamma}$	Le E	13,3 ± 0,3	220 ± 34,6
Vf I	2,7 ± 0,3	420 ± 72,1	Le O	30,2 ± 5,3	249 ± 34,6
Vf E	2,8 ± 0,3	1157 ± 140,1	Le N	34,2 ± 3,0	1337 ± 32,1
Vf Q	3,0 ± 0,1	560 ± 40,0	Μεθ. εκχ. *Lotus edulis*$^{\delta}$	48,7 ± 6,5	>1600
Vf B	3,8 ± 0,2	>1600			
Vf F	5,5 ± 0,9	1010 ± 165,2			
Vf K	6,2 ± 0,4	450 ± 50,0			
Vf N	6,9 ± 0,4	293 ± 49,3			
Vf L	9,4 ± 1,2	NT$^{\beta}$			
Μεθ. εκχ. *Vicia faba*$^{\delta}$	28,3 ± 2,7	>1600			

$^{\alpha}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. $^{\beta}$NT: Κλάσματα που δεν δοκιμάστηκαν λόγω της διάλυσής τους σε ποσοστό DMSO που επηρεάζει τα αποτελέσματα. $^{\gamma}$Το δείγμα δεν μπόρεσε να αναστείλει τη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ κατά 50% ακόμη και στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1600 μg/mL). $^{\delta}$Αρχικά ολικά μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα.

Τα κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis* ήταν επίσης ισχυροί αναστολείς της δράσης των ριζών $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*. Οι τιμές IC_{50} κυμαινόταν από 9,8 μέχρι 34,2 μg/mL και από 220 μέχρι 1337 μg/mL για τις ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$, αντίστοιχα (Πίνακας 23). Το κλάσμα Le E (ενώσεις **11a**, **11b**) είχε την πιο ισχυρή δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ ($r=0,97$, $p<0,01$) και $OH^{\bullet}$ ($r=0,95$, $p<0,01$). Το κλάσμα Le N

(ένωση **7**) που διαφέρει από τις ενώσεις του κλάσματος Le E σε μία ακετυλομάδα, επίσης προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αναστολή της δράσης των ριζών $ROO^{\bullet}$ (r=0,94, p<0,01) και $OH^{\bullet}$ (r=0,96, p<0,01). Ωστόσο το κλάσμα Le N ήταν λιγότερο ισχυρό από το Le E (Πίνακας 23, Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Προστατευτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis* απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Δράση των κλασμάτων (**A**) Le E and (**B**) Le N απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας, στήλη 2: θετικός μάρτυρας (μόνο ρίζες $ROO^{\bullet}$), στήλες 3-8: ρίζες $ROO^{\bullet}$ και τα κλάσματα σε 1, 2, 5, 10, 20 και 50 μg/mL αντίστοιχα. Δράση των κλασμάτων (**Γ**) Le E and (**Δ**) Le N απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας, στήλη 2: θετικός μάρτυρας (μόνο ρίζες $OH^{\bullet}$), στήλες 3-7: ρίζες $OH^{\bullet}$ και τα κλάσματα σε 100, 200, 400, 800 και 1600 μg/mL αντίστοιχα, στήλη 8: 1600 μg/mL κλάσμα μόνο. ΑΚ: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Υπ.: Υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Όμοια με την αντιοξειδωτική ικανότητα, τα εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* είχαν μικρότερη προστατευτική δράση σε σχέση με τα κλάσματα που απομονώθηκαν από αυτά (Πίνακες 22, 23). Ακόμη, όμοια με τα αρχικά φυτικά εκχυλίσματα, η προστατευτική δράση των κλασμάτων απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ δεν ήταν τόσο υψηλή όσο εκείνη που παρατηρήθηκε απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$. Τα πολυφαινολικά κλάσματα και των δύο εκχυλισμάτων παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$ σε συγκεντρώσεις από 1-50 μg/mL, ενώ δεν είχαν καμία επίδραση στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι οι περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις των κλασμάτων είναι ορισμένα από τα συστατικά των εκχυλισμάτων στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική και η προστατευτική τους δράση απέναντι στο DNA.

3.2.3.β. Προστατευτική δράση των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων

Λόγω της ισχυρής προστατευτικής δράσης των πολυφαινολικών κλασμάτων, δοκιμάστηκε και η δράση των απομονωμένων πολυφαινολικών ενώσεων απέναντι στις

ρίζες ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$. Από τις 14 ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα (Πίνακας 20) δοκιμάστηκαν οι 11. Οι ενώσεις **6** και **8** δεν απομονώθηκαν λόγο μικρής τους ποσότητας στα κλάσματα, ενώ οι ενώσεις **11a** και **11b** δεν ήταν δυνατό να διαχωριστούν ως μεμονωμένες ενώσεις από το κλάσμα Le E.

Όλες οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις ανέστειλαν την ικανότητα των ριζών ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA (Πίνακας 24). Η δράση των πολυφαινολικών ενώσεων διέφερε ανάμεσα στις ρίζες. Όμοια με τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα, οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις ήταν πιο δραστικές απέναντι στις ρίζες ROO$^{\bullet}$. Οι τιμές IC_{50} κυμαινόταν από 2,6 μέχρι 70 μM και από 430 μέχρι 2310 μM για τη δράση απέναντι στις ρίζες ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$ αντίστοιχα. Οι ενώσεις 2 και 3 δεν ήταν ικανές να αναστείλουν τη δράση των ριζών OH$^{\bullet}$ κατά 50% ακόμη και στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1000 μM). Η ένωση **1** παρουσίασε την πιο ισχυρή προστατευτική δράση απέναντι στις ρίζες ROO$^{\bullet}$, ενώ η ένωση **12** ήταν η πιο ισχυρή απέναντι στις ρίζες OH$^{\bullet}$. Ακόμη, με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), όλα οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας και της συγκέντρωσής τους (Πίνακας 24).

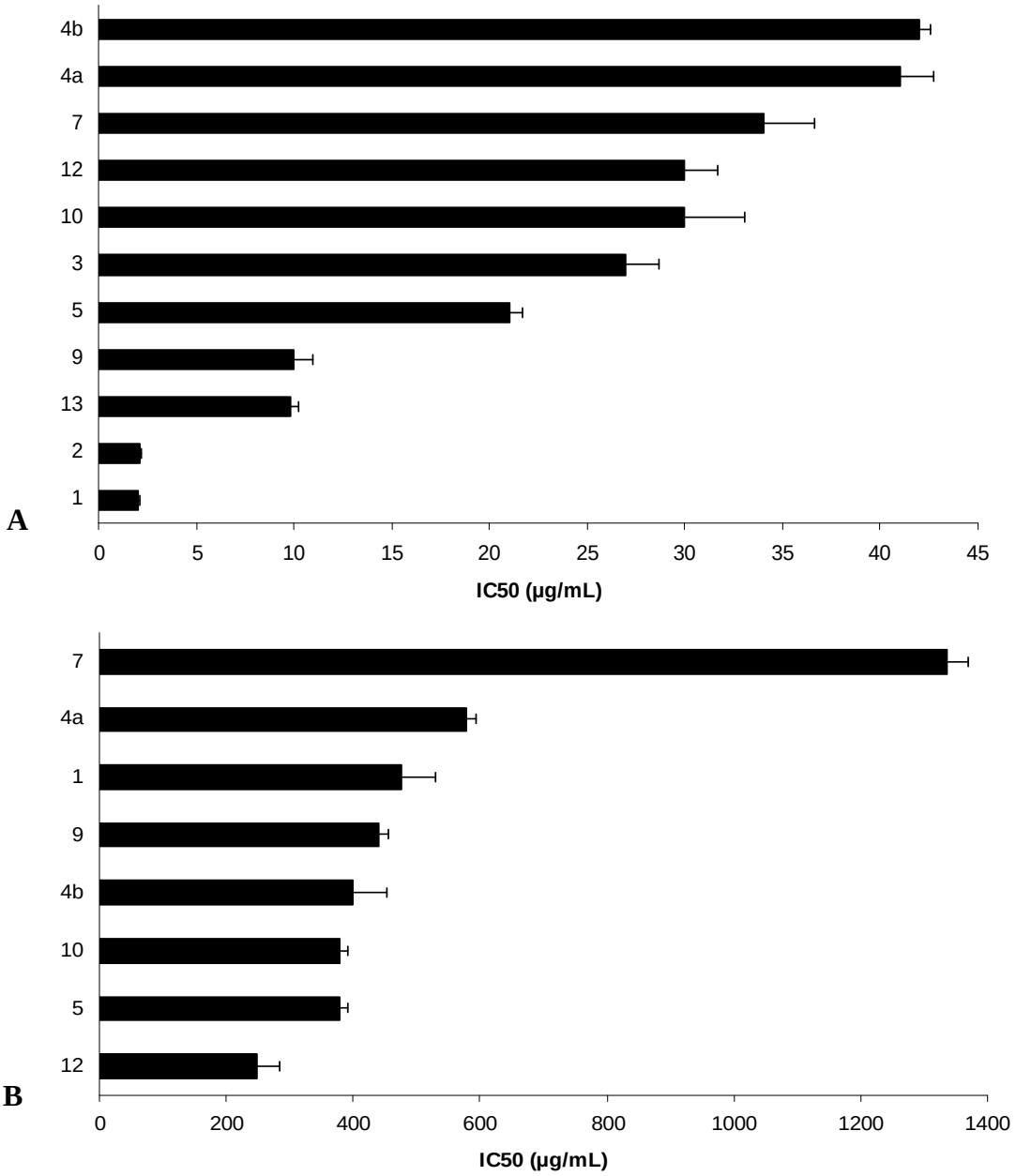
Πίνακας 24: Προστατευτική δράση των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στην επαγόμενη από ρίζες ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις	**ROO$^{\bullet}$**		**OH$^{\bullet}$**	
	IC_{50} (μM)	**r$^{\alpha}$**	**IC_{50} (μM)**	**r$^{\alpha}$**
1	2,6 ± 0,2$^{\beta}$	0,965	630 ± 70	0,951
2	2,8 ± 0,1	0,967	>1000$^{\gamma}$	0,954
13	16 ± 0,3	0,969	NT$^{\delta}$	
9	17 ± 1,7	0,973	780 ± 26	0,984
5	36 ± 1,2	0,973	640 ± 21	0,962
10	51 ± 2,8	0,943	640 ± 21	0,977
12	52 ± 5,3	0,939	430 ± 35	0,951
4a	56 ± 2,3	0,943	780 ± 20	0,972
4b	56 ± 3,5	0,973	540 ± 71	0,961
7	59 ± 3,0	0,936	2310 ± 56	0,960
3	70 ± 1,5	0,927	>1000	0,925

$^{\alpha}$r: Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\beta}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\gamma}$Το δείγμα δεν ήταν ικανό να αναστείλει τη δράση των ριζών OH$^{\bullet}$ κατά 50% ακόμη και στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1000 μM).$^{\delta}$NT: Το δείγμα δεν δοκιμάστηκε λόγω της διάλυσής του σε ποσοστό DMSO που επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Οι διαφορές στην προστατευτική δράση που παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ αποδίδονται στις διαφορές στη χημική τους δομή. Με βάση τη χημική δομή των πολυφαινολικών ενώσεων (Πίνακας 20) η ένωση **3** ήταν η μόνη ένωση που δεν ανήκε στην ομάδα των φλαβονοειδών και είχε την ασθενέστερη ανασταλτική δράση απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$. Ακόμη, δεν ήταν ικανό να αναστείλει κατά 50% την ικανότητα των ριζών $OH^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA ακόμη και στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1000 μM) (Πίνακας 24). Ακόμη, η ένωση **13** διαφέρει στην χημική της δομή, από την ένωση **12** ως προς μία ακετυλομάδα ($-COCH_3$) (Πίνακας 20). Από τις τιμές IC_{50} (μM) παρατηρείται ότι η παρουσία της ακετυλομάδας στις ενώσεις **12** και **13** φαίνεται να επηρεάζει τη δράση των ενώσεων απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$. Οι ενώσεις **4a** και **4b** είναι ισομερή της ίδιας ένωσης. Παρότι παρουσιάζουν την ίδια δράση απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ η ένωση **4b** ήταν πιο δραστική απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$ (Πίνακας 24).

Για τη σύγκριση της δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων με τα κλάσματα, προσδιορίστηκαν και οι τιμές IC_{50} (μg/mL). Οι τιμές IC_{50} (μg/mL) απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$ κυμαινόταν από 2 μέχρι 27 μg/mL και απέναντι στη δράση των ριζών $OH^{\bullet}$ από 249 μέχρι 1337 μg/mL, αντίστοιχα (Γράφημα 6). Ωστόσο, καθώς δεν δοκιμάστηκαν όλες οι πολυφαινολικές ενώσεις δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση της δράσης των καθαρών ενώσεων με τα κλάσματα. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι η πλειοψηφία των κλασμάτων παρουσίασε πιο ισχυρή δράση απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ από τις καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις. Ακόμη, φαίνεται ότι τόσο τα κλάσματα όσο και οι καθαρές πολυφαινόλες είναι δραστικές στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$ (Πίνακες 23, 24, Γράφημα 6).



Γράφημα 6: Προστατευτική δράση των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ (**A**) και $OH^{\bullet}$ (**B**).

3.2.4. Ανασταλτική δράση των πολυφαινολικών συστατικών στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Από τα αποτελέσματα μελέτης της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της ΧΟ, της CAT και της SOD παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων ανέστειλαν τη δραστικότητα της ΧΟ. Γι' αυτό τα πολυφαινολικά κλάσματα και οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* εξετάστηκαν για την επίδρασή τους στη δραστικότητα της ΧΟ.

3.2.4.α. Ανασταλτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων

Όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση στην ΧΟ. Οι τιμές IC_{50} κυμαινόταν από 40 μέχρι 135 μg/mL και από 55 μέχρι 260 μg/mL για τα κλάσματα των εκχυλισμάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* αντίστοιχα (Πίνακας 25). Όμοια με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τα πολυφαινολικά κλάσματα έδειξαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση μα τα αρχικά εκχυλίσματα από τα οποία προέκυψαν. Ακόμη, με βάση τις τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman (r), τα κλάσματα παρουσίασαν ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της ανασταλτικής τους δράσης και της συγκέντρωσής τους. Από τα κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* το πιο ισχυρό ήταν το Vf N ενώ το Vf B λιγότερο ισχυρό, ενώ από τα κλάσματα του φυτού *Lotus edulis* το Le E και Le N ήταν τα περισσότερο και το λιγότερο ισχυρό αντίστοιχα (Πίνακας 25). Τα αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη ότι τα πολυφαινολικά συστατικά που υπάρχουν στα κλάσματα είναι υπεύθυνα για την ανασταλτική δράση που παρουσίασαν και τα αρχικά εκχυλίσματα.

Πίνακας 25: Ανασταλτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων στη δραστικότητα της ΧΟ

Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba*	**IC_{50}^{α}**	**r^{β}**	**Κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis***	**IC_{50}^{α}**	**r^{β}**
Vf N	40 ± 1	0,981	Le E	55 ± 1	0,982
Vf P	55 ± 1	0,966	Le O	90 ± 9	0,963
Vf E	66 ± 2	0,972	Le B	97 ± 8	0,933
Vf I	72 ± 3	0,981	Le N	260 ± 12	0,983
Vf K	72 ± 2	0,926	Μεθ. εκχ. *Lotus edulis*$^{\gamma}$	410 ± 32	0,982
Vf C	85 ± 6	0,913			
Vf L	94 ± 3	0,983			
Vf Q	95 ± 2	0,960			
Vf F	115 ± 5	0,950			
Vf B	135 ± 6	0,900			
Μεθ. εκχ. *Vicia faba*$^{\gamma}$	540 ± 6	0,983			

$^{\alpha}$Συγκέντρωση (μg/mL) των εκχυλισμάτων που προκαλεί 50% αναστολή (IC_{50}) της ενζυμικής δραστικότητας της ΧΟ ± το τυπικό σφάλμα και είναι στατιστικά σημαντικές με $p<0,05$. $^{\beta}$Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, $p<0,01$. $^{\gamma}$Αρχικά ολικά μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα.

3.2.4.β. Ανασταλτική δράση και τύπος αναστολής των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων

Καθώς όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση στη δραστικότητα της ΧΟ πραγματοποιήθηκε πλήρης κινητική ανάλυση της δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα κλάσματα. Η πλήρης κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τις 11 από τις 14 πολυφαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα (Πίνακας 20).

Όμοια με τα κλάσματα, όλες οι πολυφαινολικές ενώσεις ανέστειλαν τη δραστικότητα της ΧΟ. Με βάση τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης οι τιμές της σταθεράς K_i κυμαινόταν από 13 μέχρι 767 μΜ (Πίνακας 26). Ακόμη, παρατηρείται ότι οι όλες πολυφαινολικές ενώσεις, εκτός από την ένωση **13** ακολουθούν τον τύπο της μη συναγωνιστικής αναστολής. Η ένωση **13** ήταν ο πιο ισχυρός αναστολέας και η μόνη ένωση που έδειξε να ακολουθεί το μοντέλο της συναγωνιστικής αναστολής. Από τους 10 μη συναγωνιστικούς αναστολείς, η ένωση **4b** ήταν ο πιο ισχυρός και η ένωση **3** ο λιγότερο ισχυρός με τιμές K_i 50 και 767 μΜ αντίστοιχα (Πίνακας 27). Ωστόσο, όλες οι ενώσεις έδειξαν ασθενέστερη ανασταλτική δράση σε σχέση με την αλλοπουρινόλη, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισχυρού αναστολέα της ΧΟ. Η αλλοπουρινόλη είναι συναγωνιστικός αναστολέας της ξανθίνης καθώς αποτελεί δομικό ανάλογο της ξανθίνης (Πίνακες 26, 27).

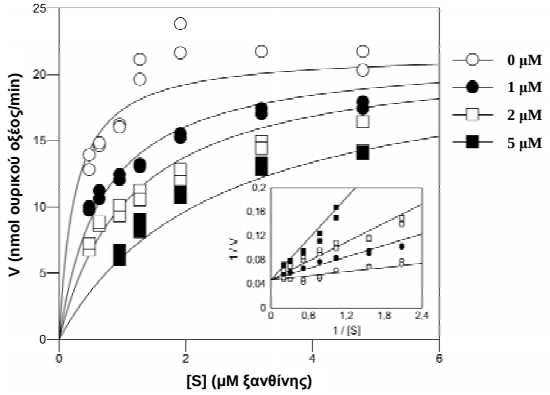
Πίνακας 26: Τύπος αναστολής και κινητικές σταθερές της ανάλυσης της ανασταλτικής δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της ΧΟ

Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις	**$K_{m\ app}$[α] (μΜ)**	**$V_{max\ app}$[α] (nmol ουρικού οξέος/min)**	**K_i (μΜ)**	**Τύπος αναστολής**
Αλλοπουρινόλη	0,24 ± 0,06	21,6 ± 0,6	0,55 ± 0,09[β]	Συναγωνιστική
13	0,23 ± 0,06	2,4 ±0,1	13 ± 2,8	Συναγωνιστική
4b	0,52 ± 0,1	1,9 ± 0,1	50 ± 3,5	Μη συναγωνιστική
1	0,54 ± 0,1	3 ± 0,1	115 ± 8	Μη συναγωνιστική
10	0,23 ± 0,04	1,7 ± 0,04	177 ± 12	Μη συναγωνιστική
2	0,46 ± 0,1	2,6 ± 0,1	186 ± 14	Μη συναγωνιστική
9	0,41 ± 0,04	3,1 ± 0,1	210 ± 15	Μη συναγωνιστική
12	0,23 ± 0,04	2,9 ± 0,1	216 ± 15	Μη συναγωνιστική
7	0,26 ± 0,03	2,8 ± 0,1	296 ± 16	Μη συναγωνιστική
5	0,43 ± 0,05	1,7 ±0,05	345 ± 33	Μη συναγωνιστική
4a	0,25 ± 0,05	2,4 ±0,04	651 ± 107	Μη συναγωνιστική
3	0,51 ± 0,1	1,7 ± 0,1	767 ± 65	Μη συναγωνιστική

[α]Προφανής σταθερές K_m και V_{max} (apparent).
[β]Η τιμή K_i της αλλοπουρινόλης συσχετίστηκε με προηγούμενες μελέτες (Pacher et al., 2006; Kelley & Beardmore, 1970).

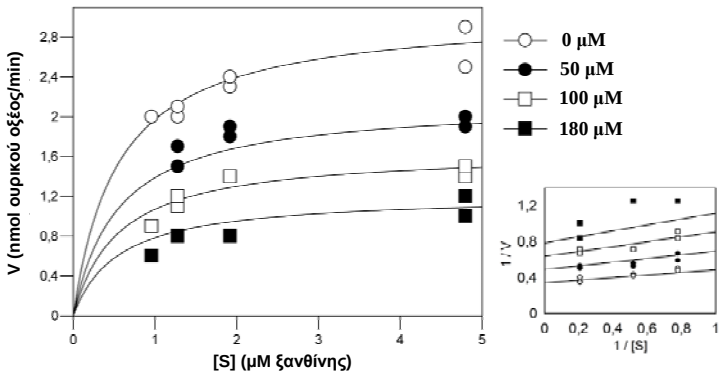
Πίνακας 27: Αναλυτικά γραφήματα κινητικής ανάλυσης της ανασταλτικής δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων

Αλλοπουρινόλη



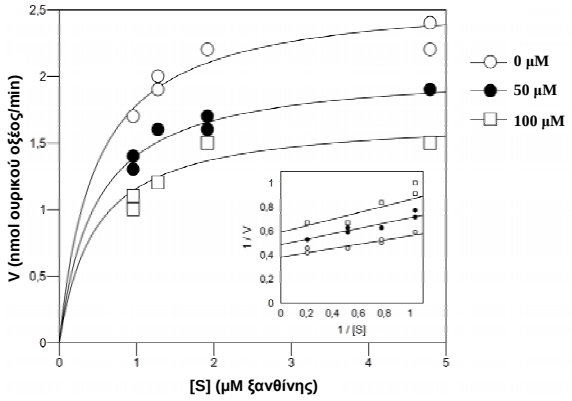
Συναγωνιστική

Ένωση 1



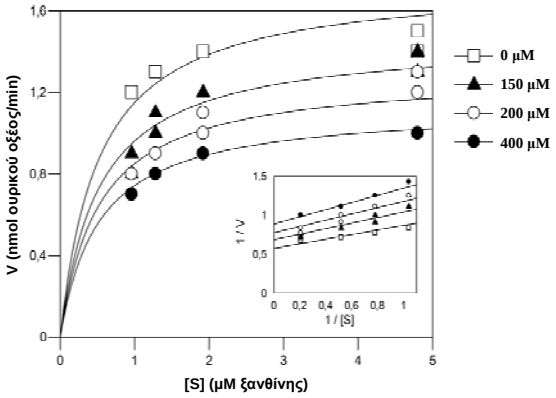
Μη συναγωνιστική

Ένωση 2



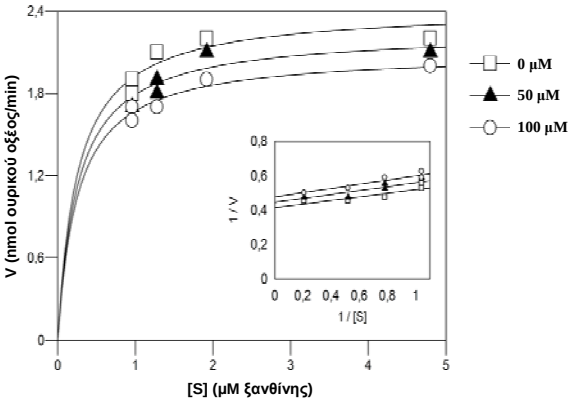
Μη συναγωνιστική

Ένωση 3



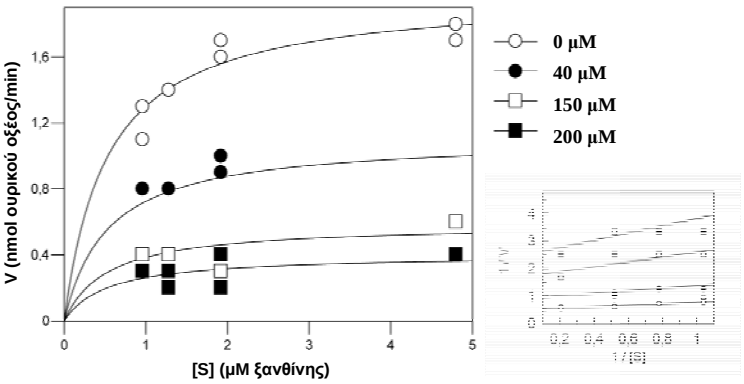
Μη συναγωνιστική

Ένωση 4a



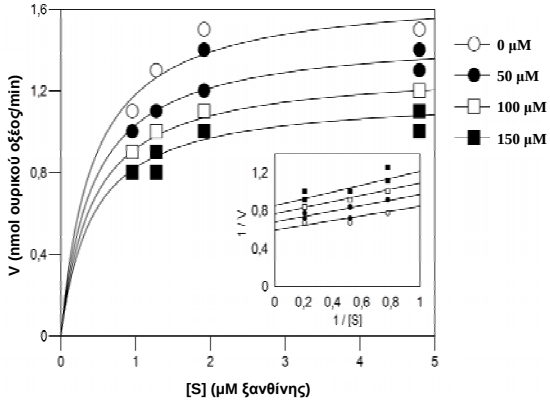
Μη συναγωνιστική

Ένωση 4b



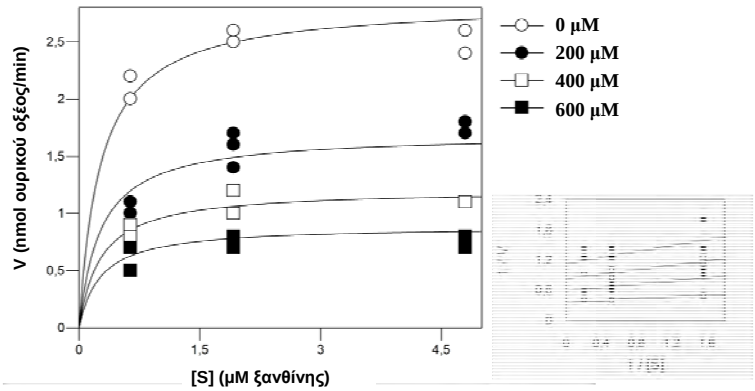
Μη συναγωνιστική

Ένωση 5

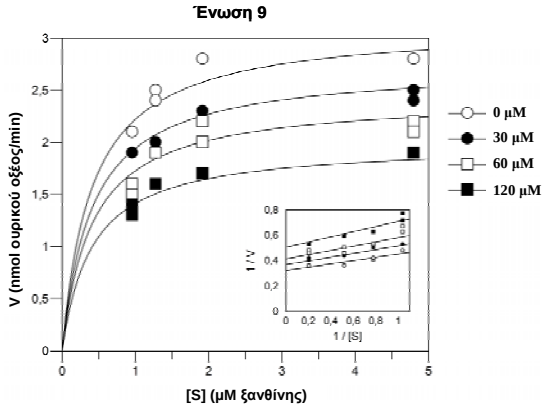


Μη συναγωνιστική

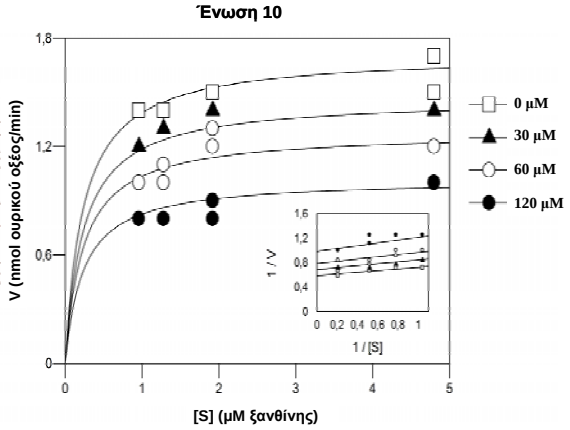
Ένωση 7



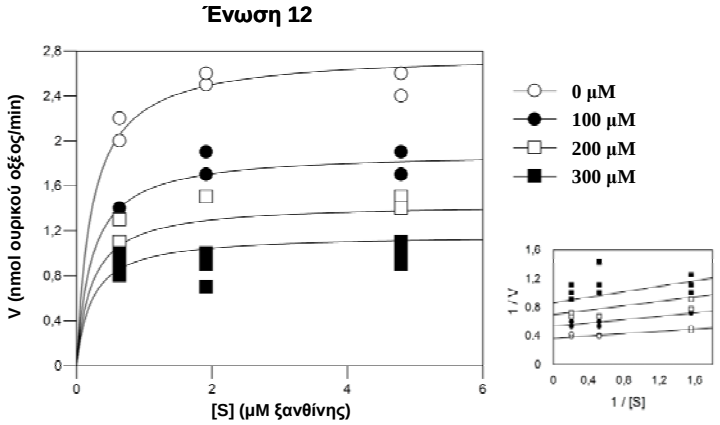
Μη συναγωνιστική



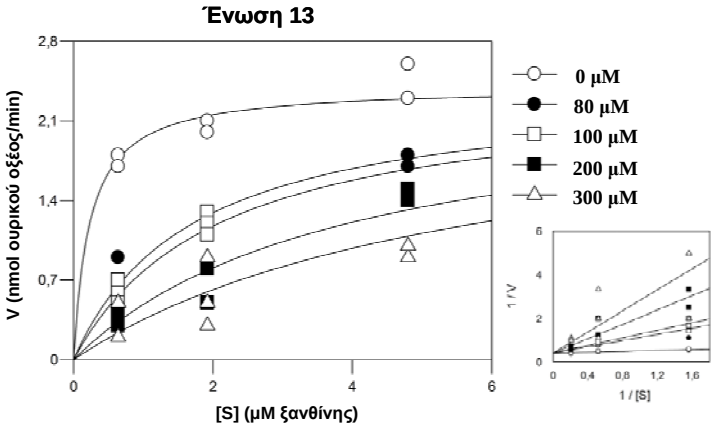
Μη συναγωνιστική



Μη συναγωνιστική



Μη συναγωνιστική

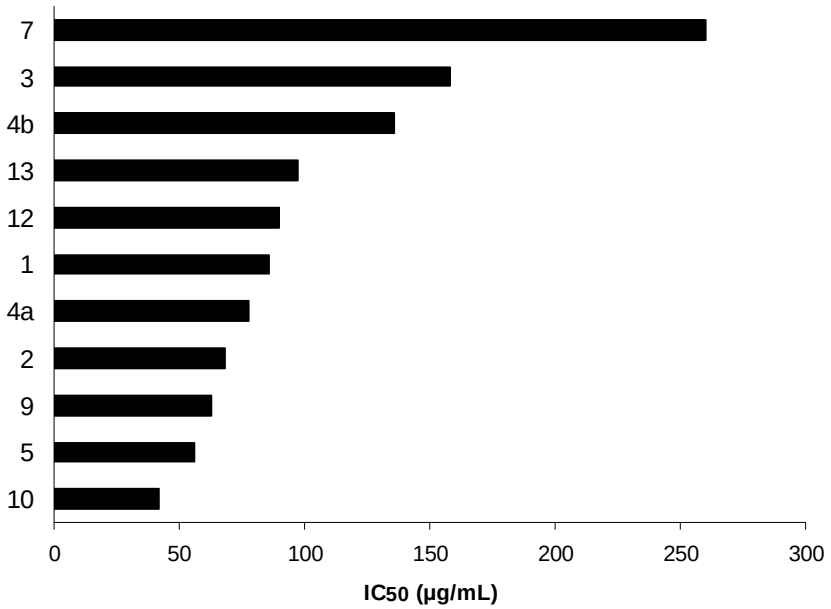


Συναγωνιστική

Οι διαφορές στην ανασταλτική δράση που παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν να αποδοθούν στις διαφορές στη χημική τους δομή. Με βάση τη χημική δομή των πολυφαινολικών ενώσεων (Πίνακας 20) η ένωση **3** ήταν η μόνη ένωση που δεν ανήκε στην ομάδα των φλαβονοειδών και είχε την ασθενέστερη ανασταλτική δράση (Πίνακας 26). Ακόμη, η ένωση **13** διαφέρει στην χημική της δομή, από την ένωση **12** ως προς μία ακετυλομάδα (-$COCH_3$), και οι ενώσεις **4a** και **4b** είναι ισομερή της ίδιας ένωσης. Συγκεκριμένα, διαφέρουν στη θέση στο επίπεδο στο χώρο μιας υδροξυλομάδας (**4a** κάτω, **4b** επάνω) στο σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο στην υδροξυλομάδα στη θέση του C3, του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Πίνακας 20).

Παρά τις ομοιότητες στη δομή παρατηρούνται διαφορές στον τύπο και στην ισχύ της ανασταλτικής δράσης. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ενώσεων **12**, **13** και **4a**, **4b** μπορεί να οφείλεται στις μικρές διαφορές στη χημική τους δομή. Ακόμη, οι ενώσεις **1**, **2**, **9** και **10** ήταν από τους πιο ισχυρούς μη συναγωνιστικούς αναστολείς της ΧΟ. Παρότι οι ενώσεις **1**, **2** και **9**, **10** είναι γλυκοσίδια κερκετίνης και καιμφερόλης αντίστοιχα και διαφέρουν στο σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο στην OH- ομάδα στον C3 της δομής τους, παρουσίασαν παρόμοια ανασταλτική δράση (Πίνακες 20, 26).

Για τη σύγκριση της δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων με τα κλάσματα, προσδιορίστηκαν και οι τιμές IC_{50} (μg/mL). Οι τιμές IC_{50}, οι οποίες προσδιορίστηκαν στη συγκέντρωση του υποστρώματος που το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό, κυμαινόταν από 42 μέχρι 260 μg/mL (Γράφημα 7). Με βάση τις τιμές αυτές τόσο τα κλάσματα όσο και οι καθαρές πολυφαινόλες φαίνεται να είναι δραστικές στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων (Πίνακας 25). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το κλάσμα Vf P το οποίο αποτελείται από τις ενώσεις **9** και **10** σε αναλογία 1:1. Οι τιμές IC_{50} των ενώσεων **9** και **10** ήταν 63 και 42 μg/mL αντίστοιχα, ενώ του κλάσματος Vf P ήταν 55 μg/mL (Πίνακας 25, Γράφημα 7).



Γράφημα 7: Τιμές IC_{50} (μg/mL) της ανασταλτικής δράσης των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της ΧΟ.

3.2.5. Ανασταλτική δράση των πολυφαινολικών συστατικών στην καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης Ι

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* ανέστειλαν την καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης Ι. Αυτή δράση υποδεικνύει ότι στα εκχυλίσματα υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την Topo I και να επηρεάζουν την δράση του. Έτσι μελετήθηκε και η ικανότητα των κλασμάτων που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα για την επίδρασή τους πάνω στην δράση της Topo I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο DNA.

Όλα τα πολυφαινολικά κλάσματα παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην καταλυτική δράση της Topo I. Η ικανότητα των κλασμάτων να αναστέλλουν τη δράση της Topo I ήταν ισχυρότερη από τα αρχικά εκχυλίσματα καθώς ήταν δραστικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις (20-200 μg/mL). Τα αρχικά μεθανολικά εκχυλίσματα, είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι σε συγκεντρώσεις > 400 μg/mL. Συνοπτικά, το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* ήταν πιο ισχυρό από αυτό του φυτού *Vicia faba* αναστέλλοντας τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι κατά 20% και 24% σε συγκεντρώσεις 400 μg/mL και 800 μg/mL, αντίστοιχα. Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* παρουσίασε αναστολή της τοποϊσομεράσης Ι κατά 21% μόνο στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση 800 μg/mL (Πίνακας 28). Ακόμη, η ισχύς της δράσης διέφερε μεταξύ των κλασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, κάποια κλάσματα ήταν δραστικά μόνο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (200 μg/mL), ενώ άλλα ανέστειλαν σχεδόν εντελώς την καταλυτική δράση του ενζύμου ακόμα και από τη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (20 μg/mL) (Πίνακας 28). Τα αποτελέσματα αυτά αποδίδονται στη διαφορετική σύσταση και αναλογία πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα κλάσματα (Πίνακας 20).

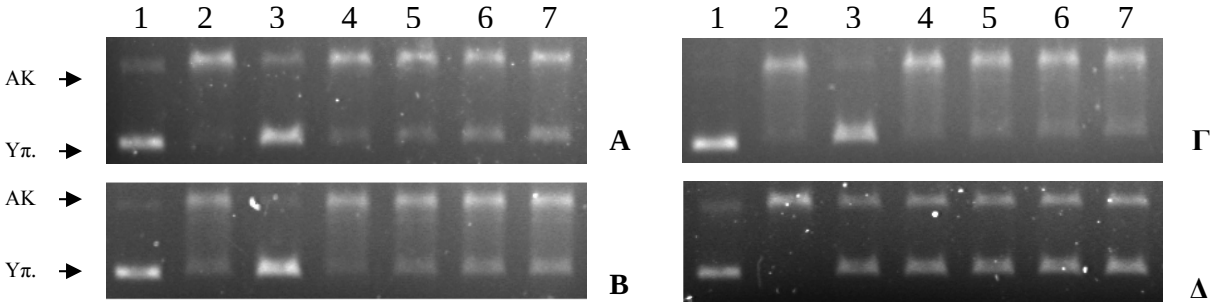
Τα κλάσματα Vf K, L και N που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* είχαν τη λιγότερο ισχυρή ανασταλτική δράση. Τα κλάσματα αυτά παρουσίασαν αναστολή της τάξης του 12, 21 και 22% αντίστοιχα, μόνο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (200 μg/mL). Μεταξύ των υπόλοιπων πολυφαινολικών κλασμάτων, τα Vf P, B, C, E και Q είχαν την πιο σημαντική ανασταλτική δράση (Πίνακας 28, Εικόνα 41). Από τα κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*, τα Le N και Le O ήταν τα πιο ισχυρά, αναστέλλοντας κατά 63 και 66% αντίστοιχα την τοποϊσομεράση Ι σε συγκέντρωση 20 μg/mL (Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Αναστολή της καταλυτικής δράσης της τοποϊσομεράσης Ι των πολυφαινολικών κλασμάτων που προέκυψαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*

Ψυχανθή	Πολυφαινολικά κλάσματα	Συγκεντρώσεις (μg/mL) 20	50	100	200
		% Αναστολή της δράσης της Topo I[α]			
Vicia faba	Vf K	NI[β]	NI	NI	12 ± 2*
	Vf L	NI	NI	NI	21 ± 1*
	Vf N	NI	NI	9 ± 4	22 ± 1*
	Vf F	NI	10 ± 2	12 ± 0,3*	20 ± 0,4*
	Vf I	8 ± 2	13 ± 2	16 ± 2*	30 ± 3*
	Vf P	17 ± 2*	22 ± 2*	39 ± 3*	50 ± 2*
	Vf B	12 ± 2	28 ± 4*	39 ± 2*	51 ± 3*
	Vf C	30 ± 4*	39 ± 3*	39 ± 4*	53 ± 5*
	Vf E	71 ± 4*	75 ± 3*	76 ± 1*	79 ± 3*
	Vf Q	79 ± 3*	83 ± 3*	83 ± 4*	94 ± 6*
Lotus edulis	Le E	NI	NI	10 ± 1	26 ± 1*
	Le B	10 ± 2	22 ± 1*	28 ± 2*	61 ± 2*
	Le N	63 ± 5*	72 ± 4*	67 ± 1*	68 ± 5*
	Le O	66 ± 6*	69 ± 6*	71 ± 6*	72 ± 7*

Ψυχανθή	Μεθανολικά φυτικά εκχυλίσματα	Συγκεντρώσεις (μg/mL) 100	200	400	800
		% Αναστολή της δράσης της Topo I[α]			
Vicia faba	Πόα[γ]	NI	NI	NI	21 ± 2*
Lotus edulis	Πόα	NI	14 ± 4	20 ± 2*	24 ± 2*

[α]Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. [β]ΝΙ 0% ανασταλτική δράση. [γ]Πόα: Υπέργεια τμήματα των φυτών. *Στατιστικά σημαντικές για $p<0,05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (DNA με 1,3 untis ένζυμου τοποϊσομεράσης Ι).



Εικόνα 41: Αναστολή της καταλυτικής δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από τα πολυφαινολικά κλάσματα των εκχυλισμάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*. Κλάσματα (**Α**) Vf P, (**Β**) Vf B, (**Γ**) Le E, (**Δ**) Le N. Στήλη 1: αρνητικός μάρτυρας. Στήλη 2: θετικός μάρτυρας. Πλασμιδιακό DNA το οποίο μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία 1,3 units Topo I μόνο (θετικός μάρτυρας), ή με παρουσία 200 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος κόκκινου σταφυλιού (στήλη 3) ή 20, 50, 100 ή 200 μg/mL, κλάσματος αντίστοιχα (στήλες 4-7). ΑΚ: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Υπ.: Υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Επειδή τα κλάσματα του φυτού *Lotus edulis* αποτελούνται από μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις, είναι εφικτή η συσχέτιση των δομικών τους χαρακτηριστικών

με τις παρατηρούμενες ιδιότητές τους στην Topo I. Τα κλάσματα Le N (ένωση **7**) και Le O (ένωση **12**) που διαφέρουν ως προς μία ακετυλομάδα από τα Le E (ενώσεις **11a**, **11b**) και Le B (ένωση **13**) είχαν πιο ισχυρή ανασταλτική δράση (Πίνακας 28, Εικόνα 41). Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι οι ακετυλομάδες πιθανόν να εμπλέκονται και να παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση των μορίων με την τοποϊσομεράση I.

3.2.6. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολικών συστατικών

Από τη μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών παρατηρήθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* δεν ήταν τόσο δραστικά στο να αναστέλλουν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Για τη μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν τα 4 πολυφαινολικά κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*, τα οποία αποτελούνται από μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις.

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι από τα 4 κλάσματα που δοκιμάστηκαν μόνο τα 2 εμφάνισαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση (Πίνακας 29). Συγκεκριμένα, τα πιο δραστικά κλάσματα ήταν τα Le B και Le E. Το Le B ανέστειλε κατά 18%, 29% και 39% την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση στις συγκεντρώσεις 50, 250 και 500 μg/mL (0,1, 0,5, 1 mg/τριβλίο), αντίστοιχα (Πίνακας 30, Γράφημα 8). Το κλάσμα Le E ήταν λιγότερο ισχυρό, έχοντας αναστέλλοντας την επαγόμενη μεταλλαξιγένεση κατά 31% μόνο στη συγκέντρωση 500 μg/mL (1 mg/τριβλίο) (Πίνακας 30, Γράφημα 8).

Πίνακας 29: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*

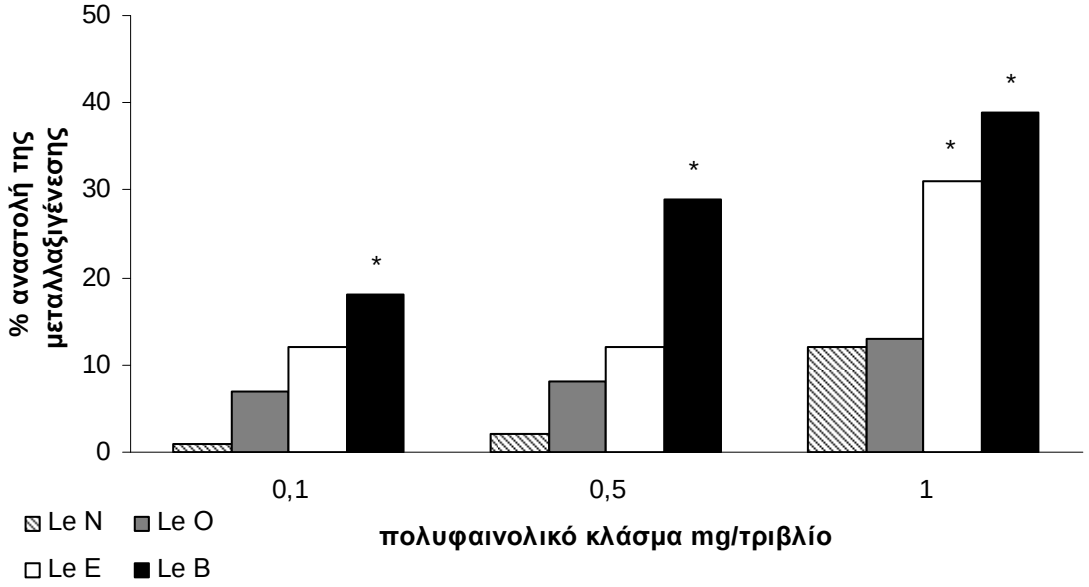
			Πολυφαινολικό κλάσμα			
			Συγκεντρώσεις (mg/τριβλίο)$^{\alpha}$			
	Αρνητικός μάρτυρας	**Θετικός μάρτυρας** (+Μπλ.)$^{\beta}$	**0,1** (+Μπλ.)	**0,5** (+Μπλ.)	**1** (+Μπλ.)	**1** (-Μπλ.)
Κλάσματα	**N^{o} His^{+} αποικίες /τριβλίο$^{\gamma}$**					
Le B	249 ± 15	797 ± 52**	699 ± 49*	640 ± 44*	586 ± 90*	218 ± 29
Le E	229 ± 31	787 ± 97**	722 ± 164	722 ± 145	611 ± 66*	217 ± 51
Le N	242 ± 27	799 ± 66**	793 ± 43	789 ± 63	730 ± 103	230 ± 17
Le O	252 ± 25	878 ± 68**	836 ± 46	830 ± 46	794 ± 34	234 ± 12

$^{\alpha}$Συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών κλασμάτων mg/mL = (mg/τριβλίο)/2. $^{\beta}$(+Μπλ.): Παρουσία μπλεομυκίνης 0,5 μg/τριβλίο. $^{\gamma}$Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα του αριθμού (N^{o}) των επαναμεταλλαγμένων His^{+} αποικιών/τριβλίο. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα, $p<0,05$. **Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, $p<0,05$.

Πίνακας 30: Ποσοστά αναστολής της μεταλλαξιγόνου δράσης της μπλεομυκίνης από τα πολυφαινολικά κλασμάτα που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*

	Συγκεντρώσεις (mg/τριβλίο)[α]		
	0,1	**0,5**	**1**
Πολυφαινολικά κλάσματα	**% Αναστολή**		
Le B	18*	29*	39*
Le E	12	19	31*
Le N	1	2	12
Le O	7	8	13

[α]Συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών κλασμάτων mg/mL = (mg/τριβλίο)/2.
*Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα, $p<0,05$.



Γράφημα 8: Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*.

Ακόμη, όλα τα κλάσματα όταν εξετάστηκαν μόνα τους στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση απουσία της μπλεομυκίνης, δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στον αριθμό των αποικιών. Σε αντίθεση με το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*, το οποίο δεν παρουσίασε καμία αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκε, τα κλάσματα ανέστειλαν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Ωστόσο, τα κλάσματα παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0,1, 0,5, 1 mg/τριβλίο) σε σχέση με εκείνες στις οποίες εξετάστηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων (0,3, 3, 6 mg/τριβλίο).

Επειδή τα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis* αποτελούνταν από μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις, είναι εφικτή η συσχέτιση των δομικών τους

χαρακτηριστικών με τις παρατηρούμενες ιδιότητές τους. Τα κλάσματα Le E (ενώσεις **11a** και **11b**) και Le B (ένωση **13**) αποτελούνται από ενώσεις που αποτελούν ακετυλιωμένες μορφές των κλασμάτων Le N (ένωση **7**) και Le O (ένωση **12**), αντίστοιχα (Πίνακας 20). Το γεγονός ότι μόνο τα πρώτα παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση, δείχνει ότι η παρουσία της ακετυλομάδας επηρεάζει την ικανότητά τους να αναστέλλουν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση.

3.3. Μελέτη της δράσης εκχυλισμάτων με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα σε κυτταρικά συστήματα

Από το σύνολο των εκχυλισμάτων που δοκιμάστηκαν για τις βιολογικές τους ιδιότητες επιλέχθηκαν δύο δραστικά υδατικά φυτικά εκχυλίσματα ψυχανθών για τη μελέτη της δράσης τους σε κυτταρικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*. Τα εκχυλίσματα αυτά με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Πίνακας 31). Ο σκοπός ήταν να παρατηρηθεί αν υπάρχει συσχέτιση με τις ιδιότητες που παρατηρήθηκαν από τις παραπάνω πειραματικές μεθόδους και σε κύτταρα καθώς και να προσδιοριστούν οι δραστικές συγκεντρώσεις σε αυτά. Για το λόγω αυτό, μελετήθηκαν οι επιδράσεις τους σε καρκινικά κύτταρα και σε φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται υπό την επίδραση ενός οξειδωτικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη και σε συστήματα της αντιοξειδωτικής άμυνας της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2 και φυσιολογικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).

Πίνακας 31: Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υδατικών εκχυλισμάτων υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*

Υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών	**IC_{50} (μg/mL)**					
	TPC[α]	**$DPPH^{\bullet}$**	**$ABTS^{\bullet+}$**	**$O_2^{\bullet-}$**	**$ROO^{\bullet}$**	**$OH^{\bullet}$**
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus*	100	80	95	>59	5	1250
Phaseolus vulgaris	28	250	220	NA	16	>1600

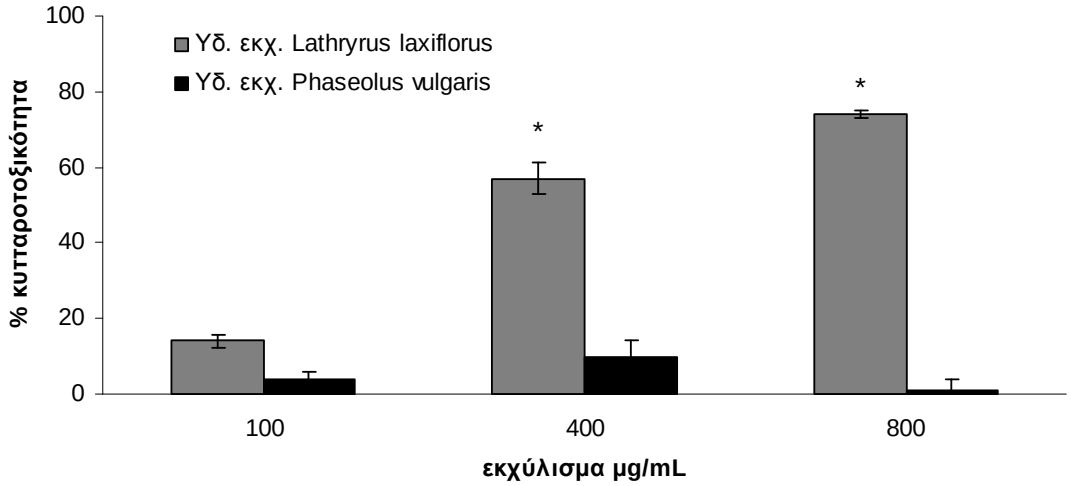
[α]TPC (mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος). NA: Καμία δράση.

3.3.1. Επίδραση των εκχυλισμάτων ψυχανθών στην ανάπτυξη και στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2

Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων Hep2

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων Hep2. Η επιλογή των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων με τις οποίες επωάστηκαν τα κύτταρα έγινε με βάση τις δραστικές συγκεντρώσεις στις οποίες παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Πίνακας 31). Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 100, 400 και 800 μg/mL. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις και τα δύο εκχυλίσματα παρατηρήθηκε ότι έχουν σημαντικές ιδιότητες να αδρανοποιούν και εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 31). Τα κύτταρα Hep2 επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα για 24 h σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 31 και ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων μετά την ολοκλήρωση της επώασης.

Από τα δύο εκχυλίσματα παρατηρήθηκε ότι μόνο το εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* είχε κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα Hep2. Το εκχύλισμα παρουσίασε μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων κατά 57% και 74% στις συγκεντρώσεις 400 και 800 μg/mL αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα (μόνο Hep2) (Γράφημα 9). Αντίθετα το εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* δεν είχε καμία κυτταροτοξική δράση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Γράφημα 9).



Γράφημα 9: Κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris* στα κύτταρα Hep2. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. *Στατιστικά σημαντικό ποσοστό με $p<0,05$ σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων Hep2. Για κάθε εκχύλισμα επιλέχθηκε μια μη κυτταροτοξική συγκέντρωση. Με βάση τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 100 μg/mL και 800 μg/mL για τα εκχυλίσματα των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris* αντίστοιχα.

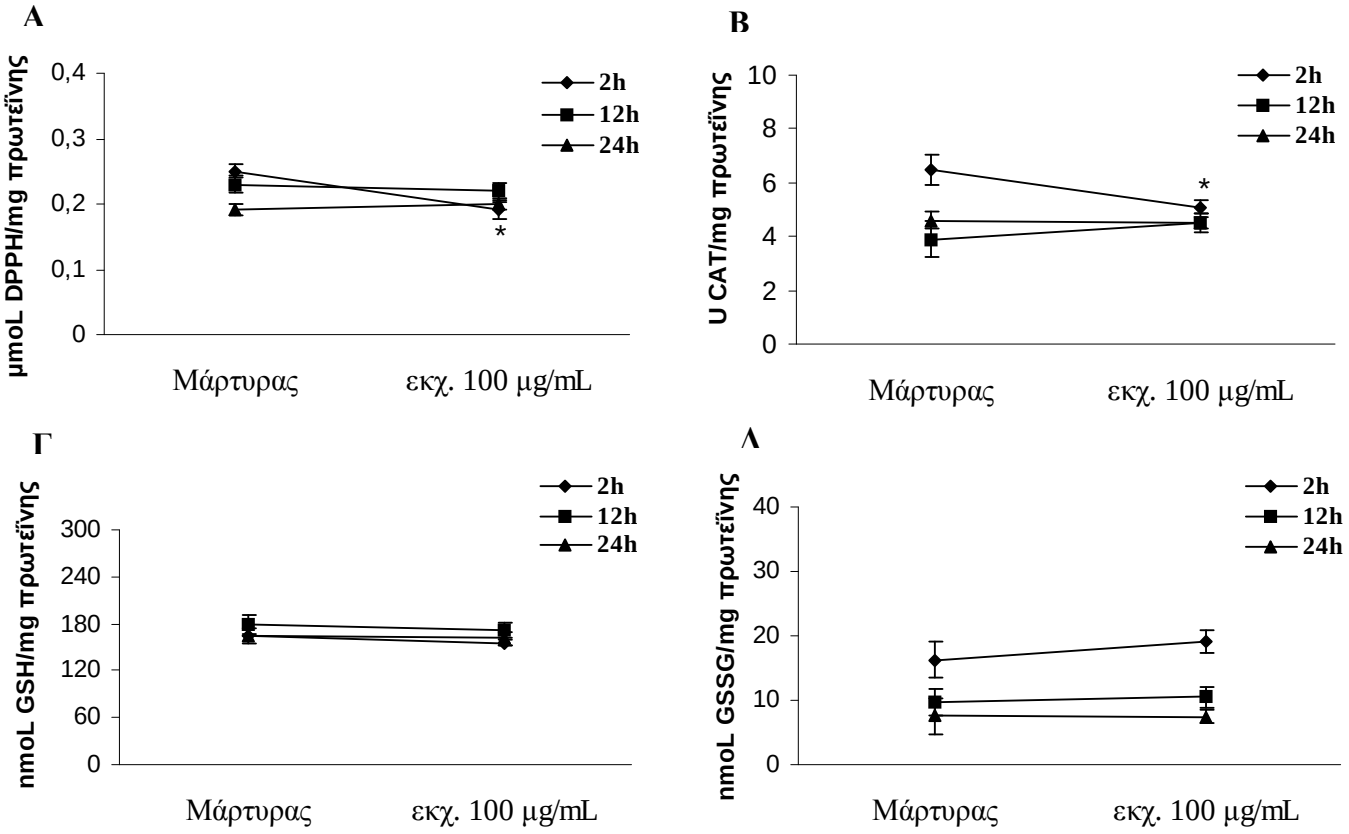
Τα κύτταρα επωάστηκαν για 2, 12 και 24 h με τα εκχυλίσματα με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 32. Οι χρόνοι επώασης των κυττάρων με τα εκχυλίσματα επιλέχθηκαν ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους σε μικρό (2 h) και σε μεγάλο χρονικό διάστημα (12 και 24 h). Για την μελέτη της επίδρασης στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων προσδιορίστηκαν η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των κυττάρων, η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) και οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης. Ακόμη ως δείκτης υπεροξείδωσης των λιπιδίων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα επηρέασαν το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων μόνο στις 2 και 12 h χρονικής επώασης. Το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στα 100 μg/mL προκάλεσε μείωση στην TAC των κυττάρων και στη δραστικότητα της CAT κατά 24% και 21% αντίστοιχα μετά από 2 h επώασης με τα κύτταρα (Γράφημα 10 A, B). Η δράση αυτή ταυτίζεται με την ιδιότητα του εκχυλίσματος να αναστέλλει κατά 50% τη δραστικότητα της CAT σε συγκέντρωση 120 μg/mL (Πίνακας 15). Το εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση στο σύστημα της γλουταθειόνης καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις της GSH, της GSSG και του λόγου GSH/GSSG σε καμία χρονική επώαση (Γράφημα 10 Γ, Δ). Ωστόσο το εκχύλισμα παρατηρήθηκε ότι προκάλεσε αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης μετά από 12 h επώασης με τα κύτταρα, καθώς η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε κατά 63% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα σε αυτή τη χρονική επώαση (Γράφημα 11).

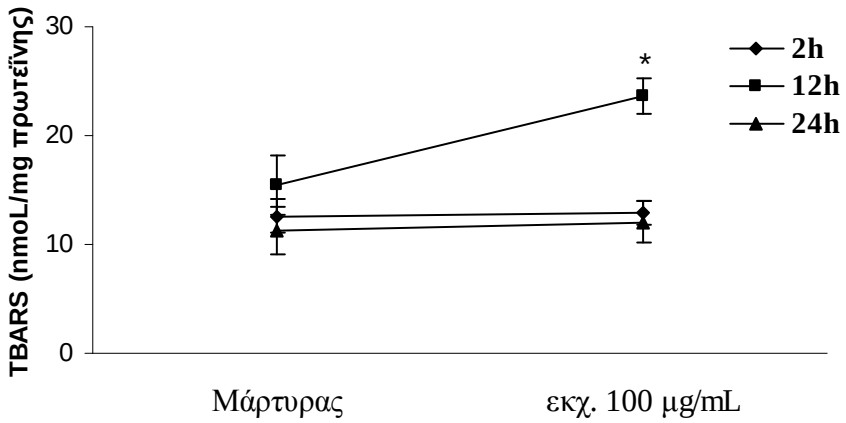
Το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* στα 800 μg/mL προκάλεσε μείωση στην TAC των κυττάρων κατά 20% μετά από 2 h επώασης με τα κύτταρα. Ωστόσο σε αντίθεση με το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* δεν επηρέασε τη δραστικότητα της CAT (Γράφημα 12 A, B). Το εκχύλισμα

δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση των TBARS (Γράφημα 13) και στο σύστημα της γλουταθειόνης και καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις της GSH, της GSSG και του λόγου GSH/GSSG σε καμία χρονική επώαση (Γράφημα 12 Γ, Δ).

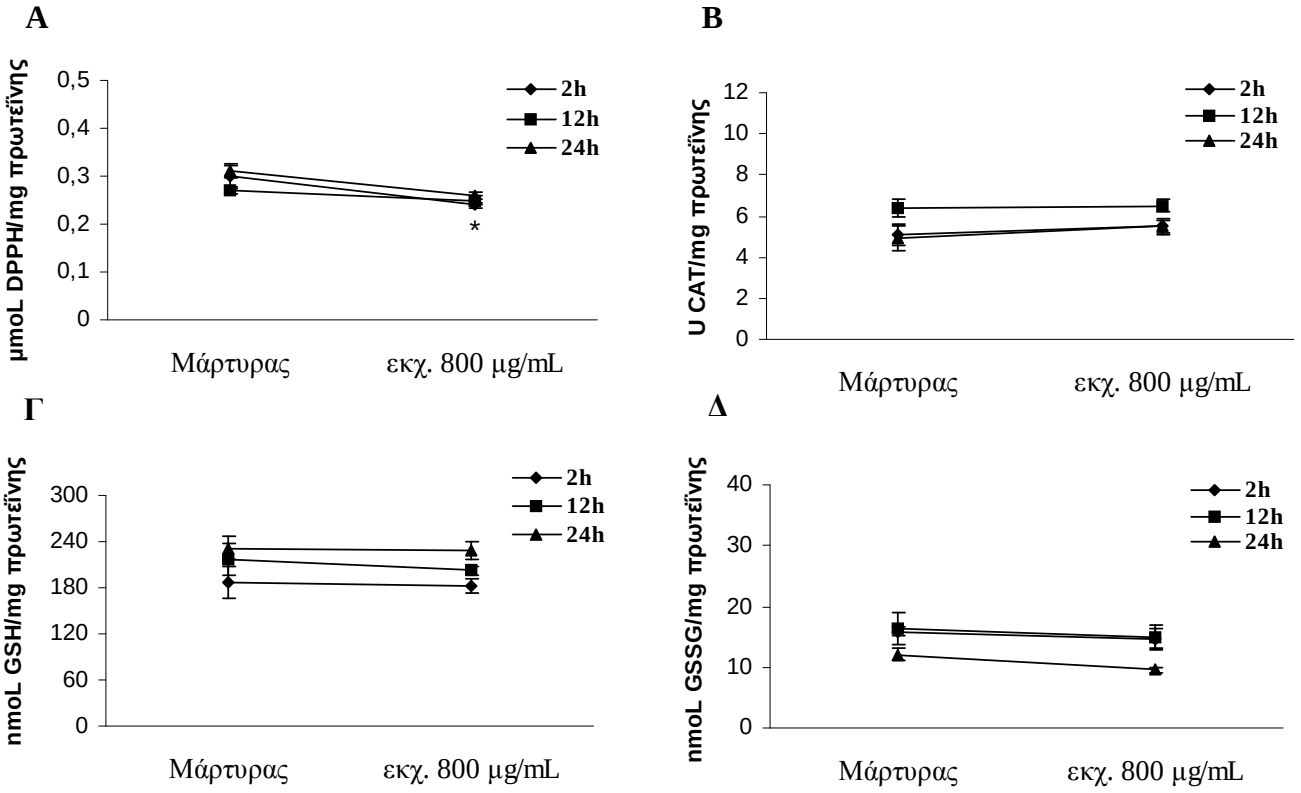
Η μείωση στην TAC των κυττάρων σε συνδυασμό με τη μείωση τη δραστικότητας της CAT και την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS αποτελούν ενδείξεις οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* σε συγκέντρωση 100 μg/mL, που έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες δρα προοξειδωτικά στα καρκινικά κύτταρα Hep2 επάγοντας σε αυτά οξειδωτικό στρες. Ανάλογη δράση αλλά λιγότερο ισχυρή έχει και το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*.



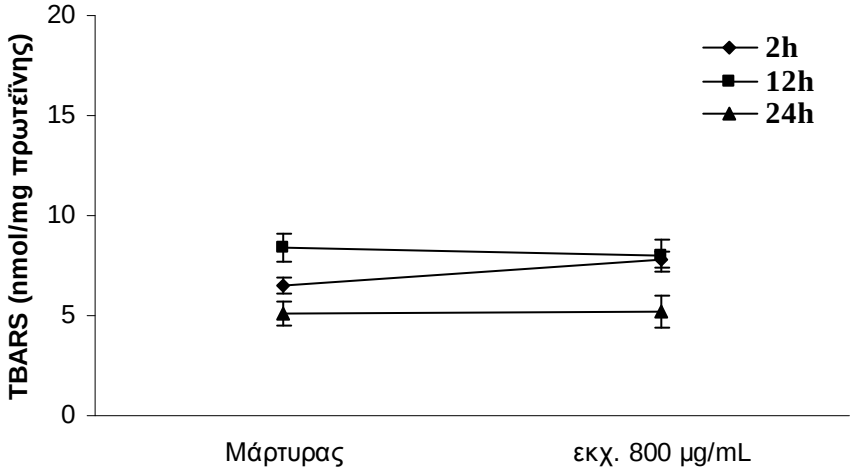
Γράφημα 10: Επίδραση 100 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* μετά από 2, 12 και 24 h επώασης στους δείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες. Επίδραση στην (**A**) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), (**B**) στη δραστικότητα της CAT και στις συγκεντρώσεις (**Γ**) της GSH και (**Δ**) της GSSG. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σχέση με τον κάθε φορά αρνητικό μάρτυρα.



Γράφημα 11: Επίδραση 100 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* μετά από 2, 12 και 24 h επώασης στο δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS. τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σχέση με τον κάθε φορά αρνητικό μάρτυρα.



Γράφημα 12: Επίδραση 800 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Phaseolus vulgaris* μετά από 2, 12 και 24 h επώασης στους δείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες. Επίδραση στην (**Α**) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), (**Β**) στη δραστικότητα της CAT και στις συγκεντρώσεις (**Γ**) της GSH και (**Δ**) της GSSG. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σχέση με τον κάθε φορά αρνητικό μάρτυρα.



Γράφημα 13: Επίδραση 800 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Phaseolus vulgaris* μετά από 2, 12 και 24 h επώασης στο δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS. τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σχέση με τον κάθε φορά αρνητικό μάρτυρα.

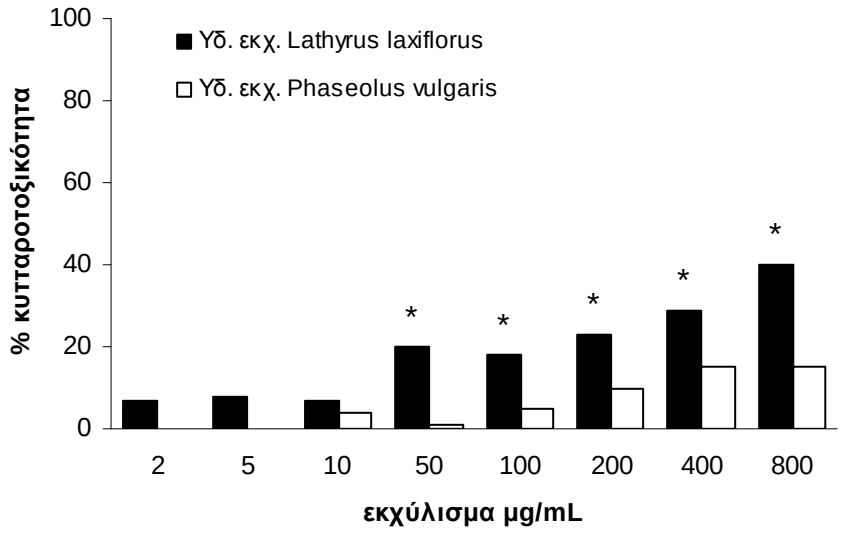
3.3.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων ψυχανθών στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των PBMCs

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα είχαν κυτταροτοξική δράση και επαγωγική δράση σε οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα Hep2. Ωστόσο οι δράσεις των εκχυλισμάτων είναι απαραίτητο να μελετηθούν και σε φυσιολογικά κυτταρικά συστήματα. Τα φυσιολογικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs). Για την παρατήρηση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων στο κυτταρικό σύστημα των PBMCs, τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στα PBMCs

Αρχικά μελετήθηκε η κυτταροτοξική επίδραση των εκχυλισμάτων στα κύτταρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 h με διαφορετικές συγκεντρώσεις, 2-800 μg/mL, των υδατικών εκχυλισμάτων υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*. Η επίδραση των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων μετά την ολοκλήρωση της επώασης. Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ήταν το μόνο από τα δύο εκχυλίσματα το οποίο είχε κυτταροτοξική δράση στα PBMCs (Γράφημα 14). Πιο συγκεκριμένα μείωσε το αριθμό των βιώσιμων κυττάρων κατά 20%, 18%, 23%, 29% και 40% στις συγκεντρώσεις 50, 100 200, 400 και 800 μg/mL αντίστοιχα σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το

εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* δεν είχε καμία κυτταροτοξική επίδραση ακόμη και στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (Γράφημα 14).



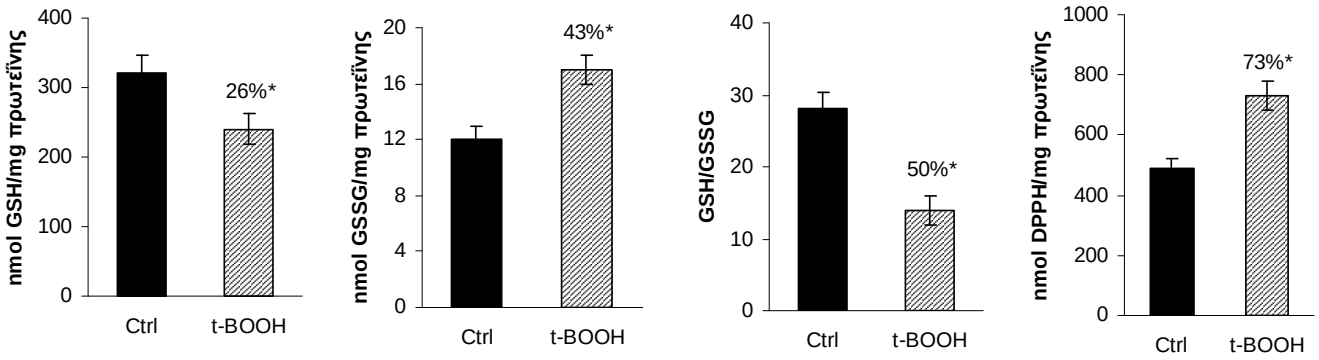
Γράφημα 14: Κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris* στα κύτταρα PBMCs.*Στατιστικά σημαντικό ποσοστό με $p<0,05$ σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας των PBMCs παρουσία οξειδωτικού παράγοντα

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στα φυσιολογικά κύτταρα όταν αυτά βρίσκονται υπό την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα που επάγει το οξειδωτικό στρες. Για κάθε εκχύλισμα επιλέχθηκαν δύο μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τα PBMCs. Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ήταν κυτταροτοξικό subsp. *laxiflorus* σε συγκεντρώσεις >10 μg/mL (Γράφημα 14). Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 5 και 10 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* και οι 400 και 800 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Στις συγκεντρώσεις αυτές μελετήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στο σύστημα της γλουταθειόνης και στην TAC των PBMCs παρουσία και απουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

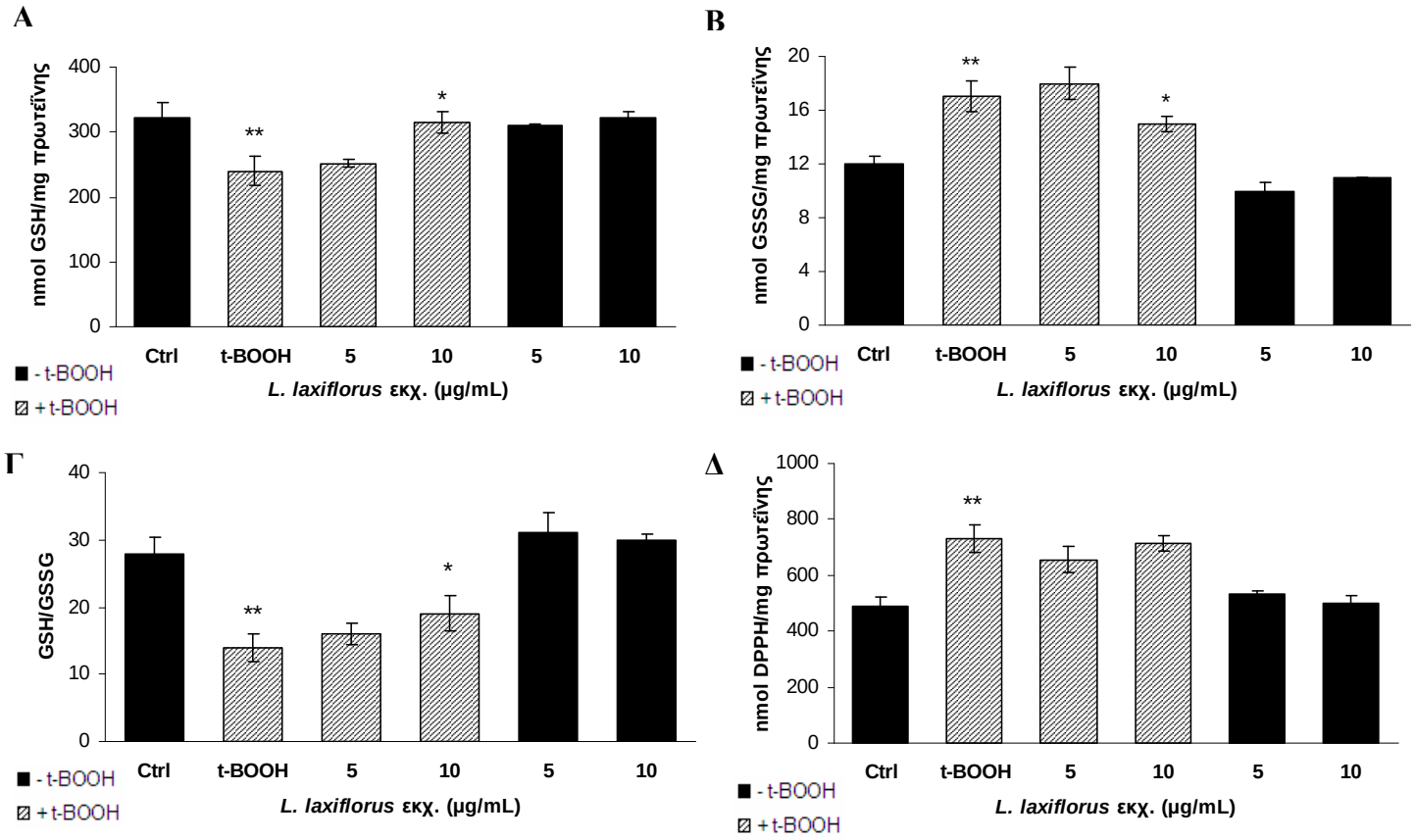
Η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH που χρησιμοποιήθηκε ήταν 80 μM. Δύο ώρες επώασης με t-BOOH 80 μM δεν ήταν κυτταροτοξική, ωστόσο προκαλούσε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα οδήγησε σε 26% μείωση και 43% αύξηση της συγκέντρωσης της GSH και της GSSG αντίστοιχα σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (Γράφημα 15). Ακόμη οδήγησε σε 50% μείωση του λόγου

GSH/GSSG και σε 73% αύξηση της TAC των κυττάρων σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (Γράφημα 15).



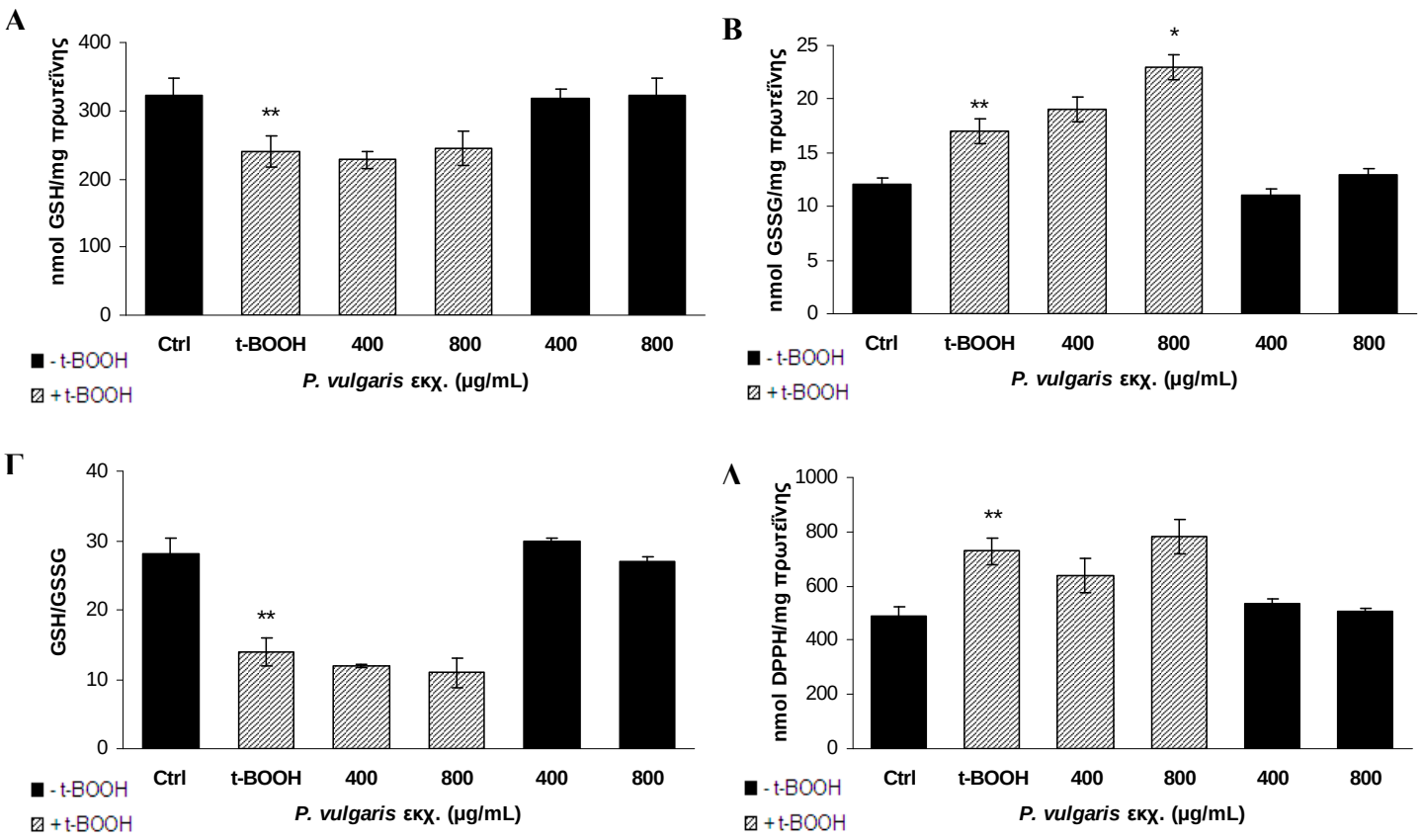
Γράφημα 15: Επαγωγή του οξειδωτικού στρες μετά από 2 h επώασης με 80 μM t-BOOH. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. Ctrl: αρνητικός μάρτυρας. *Οι τιμές ήταν στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα με $p<0,05$.

Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα επωάστηκαν για 2 h παρουσία και απουσία t-BOOH 80 μM στις συγκεντρώσεις που επιλέχτηκαν. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ήταν το μόνο εκχύλισμα που παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στις επιδράσεις του t-BOOH στο σύστημα της γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα στη συγκέντρωση 10 μg/mL έδειξε προστατευτική δράση, αυξάνοντας κατά 31% και μειώνοντας κατά 15% τη συγκέντρωση της GSH και της GSSG αντίστοιχα σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (PBMCs και 80 μM t-BOOH) (Γράφημα 16 A,B). Οι συγκεντρώσεις της GSH και της GSSG επανήλθαν κατά 91% και 51% αντίστοιχα στις τιμές του αρνητικού μάρτυρα μετά από την επώαση του εκχυλίσματος με τον οξειδωτικό παράγοντα. Ακόμη, ο λόγος GSH/GSSG αυξήθηκε κατά 37% σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (Γράφημα 16 Γ). Ωστόσο η TAC των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από το εκχύλισμα παρουσία του t-BOOH (Γράφημα 16 Δ).



Γράφημα 16: Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathryrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στο σύστημα της γλουταθειόνης και στην TAC των PBMCs υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα. Επίδραση στη (**Α**) συγκέντρωση της GSH, (**Β**) της GSSG, (**Γ**) στο λόγο GSH/GSSG και (**Δ**) στην TAC των κυττάρων παρουσία ή απουσία του 80 μM t-BOOH. Ctrl: Αρνητικός μάρτυρας. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. **Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (μόνο PBMCs). *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (PBMCs παρουσία t-BOOH).

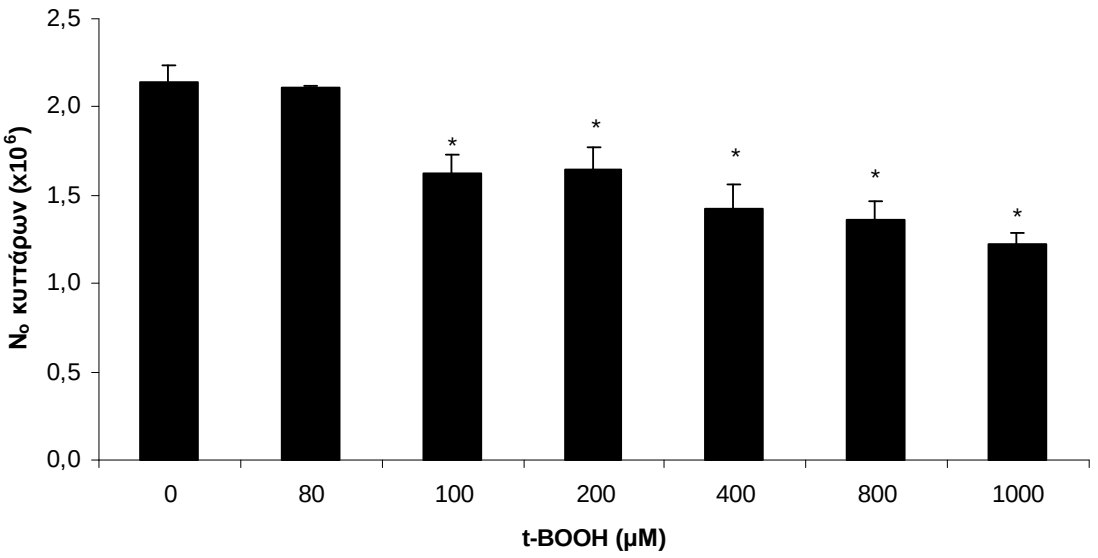
Σε αντίθεση με το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* δεν παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στις επιδράσεις του t-BOOH. Αντίθετα, το εκχύλισμα παρουσίασε προοξειδωτική δράση, καθώς στη συγκέντρωση 800 μg/mL οδήγησε σε αύξηση κατά 33% της συγκέντρωσης της GSSG παρουσία του t-BOOH, σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (PBMCs και 80 μM t-BOOH) (Γράφημα 17 Β). Η συγκέντρωση της GSH και ο λόγος GSH/GSSG δεν μεταβλήθηκε από την παρουσία του εκχυλίσματος και του t-BOOH (Γράφημα 17 Α, Γ). Ακόμη, όμοια με το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* η TAC των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από το εκχύλισμα παρουσία του t-BOOH (Γράφημα 17 Δ). Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν επηρέασε το σύστημα της γλουταθειόνης και την TAC των κυττάρων απουσία του οξειδωτικού παράγοντα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Γραφήματα 16, 17).



Γράφημα 17: Επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* στο σύστημα της γλουταθειόνης και στην TAC των PBMCs υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα. Επίδραση στη (**Α**) συγκέντρωση της GSH, (**Β**) της GSSG, (**Γ**) στο λόγο GSH/GSSG και (**Δ**) στην TAC των κυττάρων παρουσία ή απουσία του 80 μM t-BOOH. Ctrl: Αρνητικός μάρτυρας. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. **Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (μόνο PBMCs). *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (PBMCs παρουσία t-BOOH).

Επίδρασης των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα του t-BOOH στα PBMCs

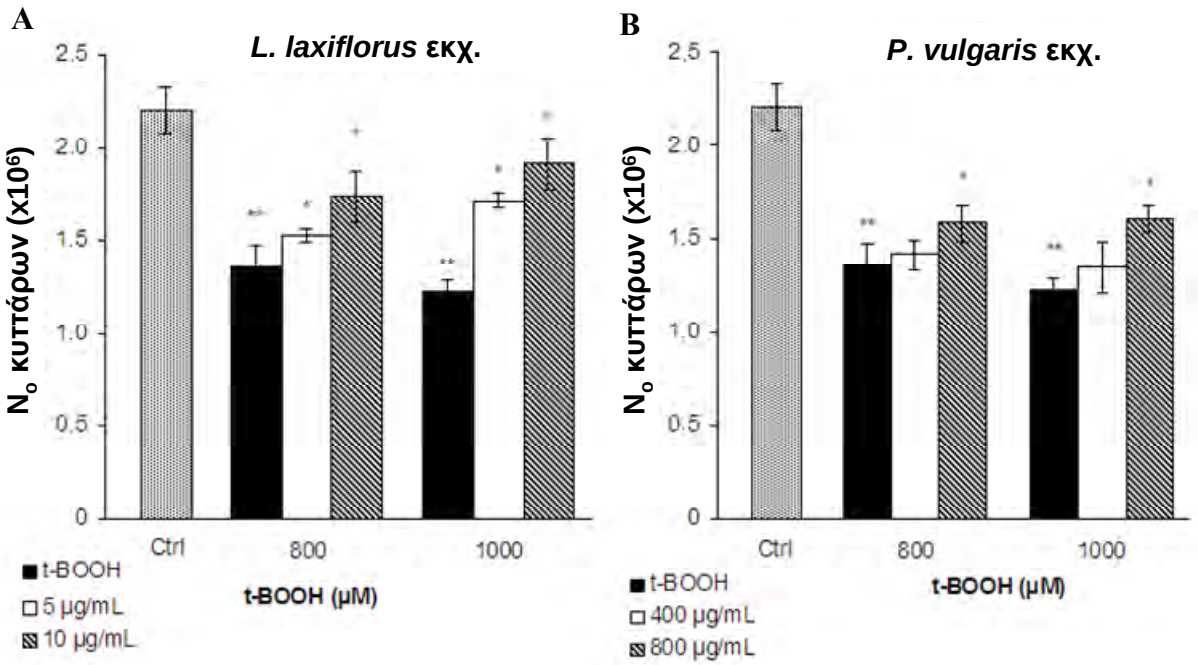
Εκτός από τις επιδράσεις των εκχυλισμάτων στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, μελετήθηκαν και οι επιδράσεις τους στην κυτταροτοξική δράση του t-BOOH στα PBMCs. Αρχικά πραγματοποιήθηκε καμπύλη κυτταροτοξικότητας διάφορων συγκεντρώσεων του t-BOOH (80, 100, 200, 400, 800, 1000 μM). Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε ποσοστό 27%, 26%, 36%, 39% και 46% μετά από 2 h επώασης με 100, 200, 400, 800, 1000 μM t-BOOH αντίστοιχα (Γράφημα 18).



Γράφημα 18: Κυτταροτοξικότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων t-BOOH μετά από 2 h επώασης με τα PBMCs.

Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα επωάστηκαν με τις συγκεντρώσεις 800 και 1000 μM t-BOOH, οι οποίες παρουσίασαν τη μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που δοκιμάστηκαν ήταν 5 και 10 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και οι 400 και 800 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν προστατευτική δράση απέναντι στην κυτταροτοξικότητα του t-BOOH (Γράφημα 19).

Πιο συγκεκριμένα, και οι δύο συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* είχαν προστατευτική δράση. Στα 5 μg/mL ανέστειλε κατά 9% και 23% και στα 10 μg/mL κατά 41% και 57% την κυτταροτοξικότητα παρουσία 800 μM και 1000 μM t-BOOH αντίστοιχα (Γράφημα 19 A). Το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* ήταν λιγότερο δραστικό παρουσιάζοντας προστατευτική δράση απέναντι στην κυτταροτοξικότητα του t-BOOH μόνο στα 800 μg/mL. Στη συγκέντρωση αυτή ανέστειλε την κυτταροτοξικότητα κατά 31% παρουσία 1000 μM t-BOOH (Γράφημα 19 B).



Γράφημα 19: Αναστολή της επαγόμενης από το t-BOOH κυτταροτοξικότητας στα PBMCs από τα υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (**A**) και *Phaseolus vulgaris* (**B**). Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα. **Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (μόνο PBMCs). *Στατιστικά σημαντικό με $p<0,05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (PBMCs παρουσία t-BOOH).

Συνολικά, από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν κυτταροτοξικό για τα PBMCs σε συγκεντρώσεις ≥ 50 μg/mL. Ωστόσο, το εκχύλισμα σε μικρότερες συγκεντρώσεις (5 και 10 μg/mL) παρουσίασε σημαντική προστατευτική δράση απέναντι στο επαγόμενο οξειδωτικό στρες και κυτταροτοξικότητα από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH. Το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* παρότι δεν ήταν κυτταροτοξικό παρουσίασε προοξειδωτική δράση, η οποία ωστόσο παρατηρήθηκε σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση (800 μg/mL). Ακόμη, σε υψηλές κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα, και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική προστατευτική δράση (800 μM και 1000 μM). Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής της κυτταροτοξικότητας του t-BOOH σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτό του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Τα αποτελέσματα δείχνουν τη σημασία των δραστικών συγκεντρώσεων σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Εκχυλίσματα ψυχανθών ως πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής (Kelloff et al., 2000; Shukla et al., 2004). Τα ψυχανθή και ιδιαίτερα οι καρποί τους, τα όσπρια, που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη) (Mathers, 2002), καρδιαγγειακές παθήσεις (Anderson et al., 1999) και διαβήτη (Venn & Mann, 2004). Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί εκτός από τα κύρια διατροφικά συστατικά των ψυχανθών και στις περιεχόμενες σε αυτά βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, στις οποίες οφείλονται οι ευεργετικές τους ιδιότητες (Mathers, 2002; Rochfort & Panozzo, 2007). Το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις ποικιλίες των ψυχανθών καθώς και μεγάλη ποικιλομορφία στη σύστασή τους σε φυτοχημικές ενώσεις, καθιστά σημαντική την διεξαγωγή ερευνών πάνω στις βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα ψυχανθή καθώς και τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, μελετήθηκαν οι βιολογικές ιδιότητες διάφορων εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα υπέργεια τμήματα, τους καρπούς και τα σπέρματα 11 ελληνικών ψυχανθών (Πίνακας 5). Επιλέχθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και άλλα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα (Andersen & Markham, 2006). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων με διάφορες *in vitro* δοκιμές. Καθώς οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που εμπλέκονται με διάφορους μηχανισμούς στην καρκινογενετική διαδικασία (Klaunig & Kamendulis, 2004), περισσότερη έμφαση δόθηκε στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων.

Αρχικά, προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων και παρατηρήθηκε ότι τόσο στα υδατικά όσο και στα μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών υπάρχουν πολυφαινολικές ενώσεις (Πίνακας 6). Στην πλειοψηφία τους τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών είχαν μεγαλύτερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα καρπών. Οι περισσότερες έρευνες αφορούν κυρίως στα εδώδιμα τμήματα των ψυχανθών όπως σπέρματα, καρπούς και περικάρπιο των οσπρίων. Προηγούμενες μελέτες έχουν προσδιορίσει το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σε εκχυλίσματα καρπών από διαφορετικές ποικιλίες ψυχανθών. Όμοια με τα

εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (Amarowicz & Pegg, 2008). Το διαφορετικό συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάμεσα στα εκχυλίσματα οφείλεται στο ότι προέρχονται από διαφορετικά φυτά και από τμήματα του ίδιου φυτού (Πίνακας 6). Οι διαφορές οφείλονται επίσης στη διαφορετική διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στη μεθανόλη και στο νερό που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλισή τους.

Από τους σημαντικότερους χημειοπροστατευτικούς μηχανισμούς είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και η παρεμπόδιση των επιβλαβών τους επιδράσεων. Έτσι, αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν διαφορετικές ελεύθερες ρίζες. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διάφορων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων (Santchez-Moreno, 2002; Kaur & Geetha, 2006). Από τις πιο χαρακτηριστικές μεθόδους είναι εκείνες που εκτιμούν την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της αλληλεπίδρασής με τις ρίζες $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ και $O_2^{\bullet-}$, οι οποίες εφαρμόστηκαν και στην παρούσα μελέτη (Prior et al., 2005). Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες ($OH^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε καθαρό απομονωμένο πλασμιδιακό DNA. Η συνδυαστική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων συνέβαλε στην πιο άρτια εκτίμηση των ιδιοτήτων τους καθώς και της αντιοξειδωτικής τους ισχύος για την περαιτέρω μελέτη των πιο δραστικών.

Από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν σε αυτά ενώσεις, οι οποίες έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ και $O_2^{\bullet-}$. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η δράση τους ήταν πιο αποτελεσματική απέναντι στις ρίζες $DPPH^{\bullet}$ και $ABTS^{\bullet+}$ παρά στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Πίνακες 7-11). Οι διαφορές στη δραστικότητα απέναντι στις ρίζες αποδίδεται στη διαφορετική φύση των ριζών. Παρότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα δεν είχαν σημαντικές ιδιότητες απέναντι στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$, εκχυλίσματα από περικάρπια και σπέρματα διάφορων ψυχανθών παρουσίασαν σε προηγούμενες μελέτες σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Troszynska & Kubicka, 2001; Lin et al., 2001).

Τα πιο μελετημένα ψυχανθή για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων τους είναι τα κοινά φασόλια (*Phaseolus vulgaris*) και οι φακές (*Lens culinaris*). Σε προηγούμενες μελέτες εκχυλίσματα από σπέρματα και περικάρπια διαφόρων ποικιλιών κοινών φασολιών (Heimler et al., 2005; Cardador-Martinez et al., 2002; Madhujith et al.,

2004) και φακής (*Lens culinaris*) (Dueñas et al., 2006, 2003) παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδόθηκαν στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Στην παρούσα μελέτη τα εκχυλίσματα σπερμάτων των κοινών φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) και της φακής (*Lens culinaris*) είχαν τις ασθενέστερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς και το μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) είχαν τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ήταν τα μόνα που είχαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $DPPH^{\bullet}$ και $ABTS^{\bullet+}$ σε $O_2^{\bullet-}$ σε συγκεντρώσεις <100 μg/mL, ενώ είχαν και το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (Πίνακες 6-11). Με βάση τα παραπάνω παρατηρείται ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων τόσο πιο ισχυρές ήταν οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες ιδιότητες των εκχυλισμάτων αποδίδονται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις και στη διαθεσιμότητα των φαινολικών υδρογόνων τους (Blokhina et al., 2003; Ferguson, 2001). Ωστόσο, οι διαφορές ανάμεσα στην ειδική δραστικότητα των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες, η οποία εκφράζεται ωε το ποσό των ριζών που εξουδετερώνονται/ μg πολυφαινολών και τις τιμές IC_{50} αποτελεί ένδειξη ότι στην ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών δεν παίζει ρόλο μόνο η ποσότητα των πολυφαινολικών ενώσεων αλλά και η ποιοτική τους σύσταση.

Εκτός από την ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές/προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στην επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από τις ρίζες $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$. Η δράση τους αυτή εκτός από αντιοξειδωτική θεωρείται και αντιμεταλλαξογόνος καθώς τα μονόκλωνα θραύσματα στο DNA αποτελούν έναν μηχανισμό μεταλλαξιγόνου δράσης των ελευθέρων ριζών (Klaunig & Kamendulis, 2004). Οι ιδιότητες αυτές έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα εκχυλίσματα ψυχανθών, ιδιαίτερα σπερμάτων φασολιών (Zielinski, 2002; Madhujith et al., 2004). Η παρατηρούμενη προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων υποδεικνύει ότι στα εκχυλίσματα υπάρχουν ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με αυτές τις ελεύθερες ρίζες και να εμποδίζουν τη δράση τους. Τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν εκείνα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (Πίνακες 12, 13).

Όμοια με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, η προστατευτική δράση τους διέφερε και απέναντι στη δράση των δύο ριζών (Πίνακες 12, 13). Τα εκχυλίσματα ήταν πιο δραστικά απέναντι στις ρίζες $ROO^{\bullet}$ (Πίνακες 12, 13). Αυτό το αποτέλεσμα αποδίδεται στο γεγονός ότι οι ρίζες $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ είναι δύο διαφορετικές

ROS και υποδεικνύει ένα διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης των βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων με τις ρίζες αυτές. Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στη δράση των ριζών $ROO^{\bullet}$ σε συνάρτηση με το γεγονός ότι αυτές οι ρίζες είναι από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Mylonas & Kouretas, 1999), υποδεικνύουν ότι αυτά τα εκχυλίσματα ίσως να αποτρέπουν τη λιπιδική υπεροξείδωση. Επιπρόσθετα, επειδή οι ρίζες $ROO^{\bullet}$ και η λιπιδική υπεροξείδωση μπορούν ανεξάρτητα να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο DNA (Rodriguez et al., 1999; Lim et al., 2004), οι οποίες αποτελούν τη βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν έναν μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$ είναι πολύ σημαντική καθώς οι ρίζες $OH^{\bullet}$ θεωρούνται από τις πιο ενεργές δραστικές μορφές οξυγόνου που είναι υπεύθυνες για πολλές τροποποιήσεις στο DNA (Marnett, 2000; Cadet et al., 1999). Η προστατευτική τους δράση απέναντι στις ρίζες $OH^{\bullet}$ μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων να εμποδίζουν την αλληλεπίδραση των ριζών $OH^{\bullet}$ με τα άτομα υδρογόνου στους C3΄, C4΄ και C5΄ της ομάδας του σακχάρου του σκελετού του DNA, καθώς αυτή η αλληλεπίδραση είναι υπεύθυνη για την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA (Cadet et al., 1999). Η UV ακτινοβολία προκαλεί παραγωγή ριζών $OH^{\bullet}$ και θεωρείται ο κύριος παράγοντας πρόκλησης ασθενειών του δέρματος συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Zhang et al., 1997). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτά τα εκχυλίσματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή παραγόντων, που μπορούν να αποτρέψουν τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας.

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επιβλαβή δράση τους στο DNA, αντικατοπτρίζουν σημαντικούς μηχανισμούς χημειοπροστατευτικής δράσης των περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων. Ως συνέχεια των παραπάνω ιδιοτήτων παρατηρήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της XO, της CAT και της SOD. Η XO είναι ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και εμπλέκονται με το οξειδωτικό στρες, ενώ η CAT και η SOD είναι από τα πιο σημαντικά ένζυμα στο σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστικότητα της XO και της CAT, ενώ είχαν επαγωγική δράση στη δραστικότητα της SOD (Πίνακες 14, 15 Εικόνα 38). Η ανασταλτική τους δράση απέναντι στην XO ήταν

πιο ισχυρή σε σχέση με την επίδρασή τους στα άλλα δύο ένζυμα, καθώς τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την ΧΟ σε συγκεντρώσεις στις οποίες δεν είχαν καμία δράση στην CAT και την SOD. Τα μόνα εκχυλίσματα, τα οποία ανέστειλαν την CAT σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ό,τι την ΧΟ προέρχονταν από το φυτό *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (Πίνακες 14, 15). Ακόμη, τα εκχυλίσματα επηρέασαν τη δραστικότητα της SOD σε συγκεντρώσεις >1 mg/mL, οι οποίες είναι αρκετά υψηλές σε σύγκριση με τις δραστικές συγκεντρώσεις στα άλλα ένζυμα. Ακόμη, τρία από τα εκχυλίσματα εκτός από την επαγωγική τους δράση στην SOD ανέστειλαν εν μέρει και την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης υποδεικνύοντας ότι σε αυτά υπάρχουν ενώσεις που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Ανάμεσα σε αυτά ήταν και το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, το οποίο ήταν από τα δύο πιο ισχυρά εκχυλίσματα καθώς εξουδετέρωνε τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ σε συγκεντρώσεις <100 μg/mL. Η δράση τους αυτή αποδίδεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες δεσμεύουν και παρεμποδίζουν τη δράση των ριζών $O_2^{\bullet-}$ (Moridani et al., 2002; Troszynska & Kubicka, 2001).

Με βάση τις αντιδράσεις που καταλύουν τα τρία εξεταζόμενα ένζυμα, η CAT και η SOD συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ριζών που παράγονται από τη δράση της ΧΟ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά στο να εμποδίζουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών από την ΧΟ, παρά στην εξουδετέρωσή τους μέσω της δράσης της CAT και της SOD (Εικόνα 38). Καθώς οι περισσότερες μελέτες αντιμετωπίζουν την ΧΟ ως σημαντικό ένζυμο που συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων αντικατοπτρίζει έναν χημειοπροστατευτικό μηχανισμό των βιοδραστικών τους συστατικών (Cotelle, 2001; Van Hoorn et al., 2002).

Η ΧΟ αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, η δράση της σχετίζεται με καταστάσεις ισχαιμίας, υποξίας, υπέρτασης καθώς και με τη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, την αθηροσκλήρωση, το διαβήτη και διάφορες μορφές καρκίνου (Borges et al., 2002). Ωστόσο, η δράση της σχετίζεται και με παθολογικές καταστάσεις εξαιτίας της συμμετοχής της στην παραγωγή του ουρικού οξέος. Η ουρική αρθρίτιδα είναι μια πάθηση, κατά την οποία υπέρμετρη παραγωγή ουρικού οξέος οδηγεί στην κρυστάλλωσή του και στην εναπόθεσή του στις αρθρώσεις, τους συνδετικούς ιστούς και τους νεφρούς (Halliwell, 1996). Έτσι, η αναστολή της δράσης της ΧΟ δεν έχει μόνο ενδιαφέρον ως προς την παρεμπόδιση της παραγωγής ελευθέρων ριζών αλλά έχει

και θεραπευτική σημασία. Ο πιο γνωστός και μελετημένος αναστολέας της, ο οποίος χρησιμοποιείται και ως φάρμακο στις προηγούμενες παθολογικές καταστάσεις είναι η αλλοπουρινόλη (Pacher et al., 2006; Kelley and Beardmore, 1970). Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της ΧΟ καθιστά τα εκχυλίσματα ως σημαντική πηγή φυσικών αναστολέων του ενζύμου.

Ακόμη, η ΧΟ εκτός από τη συσχέτισή της με παθολογικές καταστάσεις, είναι ίσως το κυριότερο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης (Ji, 1999, Gomez-Cabrera et al., 2005). Ακόμη, η ΧΟ συμβάλλει επίσης στην παραγωγή του ουρικού οξέος, το οποίο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος (McCord & Fridovich, 1968). Έτσι, η αναστολή της οδηγεί όχι μόνο στη μείωση των παραγόμενων ελεύθερων ριζών αλλά και στη μείωση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό κατά πόσο η μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών ή του ουρικού οξέος είναι πιο σημαντική κατά την άσκηση. Ωστόσο, σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση αλλοπουρινόλης πριν την άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες και μείωση της απόδοσης μετά από εξαντλητική αερόβια άσκησης σε επίμυες (Veskoukis et al., 2008). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι η παραγωγή του ουρικού οξέος ήταν πολύ σημαντική κατά την άσκηση. Επομένως, θα είχε ενδιαφέρον και η παρατήρηση των επιδράσεων των εκχυλισμάτων και σε περιβάλλον άσκησης.

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασαν ανασταλτική δράση στη δραστικότητα της CAT σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την ΧΟ. Τα εκχυλίσματα αυτά είχαν και το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο στις δραστικές συγκεντρώσεις (Πίνακες 14, 15). Καθώς η CAT είναι ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα της αντιοξειδωτική άμυνας, η αναστολή της αντικατοπτρίζει έναν μηχανισμό προοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος.

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, τα εκχυλίσματα μπορεί να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες και με άλλους μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι οι τοποϊσομεράσες είναι αποτελεσματικοί χημειοθεραπευτικοί στόχοι αφού η δράση τους εντείνεται στα καρκινικά κύτταρα. Η τοποϊσομεράση Ι είναι ένα βασικό ένζυμο για ζωτικές λειτουργίες των κυττάρων και οι αναστολείς της θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Wang, 1996, 1997). Έτσι, τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν για τις επιδράσεις τους στη δράση της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης Ι στο DNA. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων ψυχανθών που

δοκιμάστηκαν δεν επηρέαζαν τη δράση της τοποϊσομεράσης Ι. Ωστόσο, δείχνουν ότι στα εκχυλίσματα των φυτών *Lathyrus laxiflorus* (υδατικό/μεθανολικό), *Vicia faba* (υδατικό/μεθανολικό) και *Lotus edulis* (μεθανολικό) υπάρχουν ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στις περισσότερες συγκεντρώσεις ανασταλτική δράση, στις οποίες μπορεί να θεωρηθούν ως καταστολείς της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι. Αντίθετα, το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* σε μια συγκέντρωση (800 μg/mL) παρουσίασε επαγωγική δράση στην τοποϊσομεράση Ι, υποδεικνύει έναν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης των συστατικών του εκχυλίσματος με το ένζυμο. Γενικότερα, παράγοντες οι οποίοι επάγουν την δράση των τοποϊσομερασών θεωρείται ότι δρουν κυρίως σταθεροποιώντας το ομοιοπολικό σύμπλοκο του ενζύμου με το DNA που προκαλεί συνεχόμενα σπασίματα και δρουν ως poisons (Lopez-Lazaro et al., 2002). Παρόμοια δράση με αυτή του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* παρατηρήθηκε να έχει η λουτεΐνη, η οποία σε άλλες συγκεντρώσεις δρα σαν αναστολέας του ενζύμου ενώ σε άλλες επάγει τη δράση του δρώντας ως poison (Chowdhury et al., 2002). Οι παρατηρούμενες δράσεις των εκχυλισμάτων απέναντι στην τοποϊσομεράση Ι αντικατοπτρίζουν έναν ακόμη μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης των περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων.

Καθώς οι μεταλλάξεις αποτελούν τη βασική προϋπόθεση της έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας, μελετήθηκε και η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων. Σε προηγούμενες μελέτες εκχυλίσματα καρπών κοινών φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) παρουσίασαν σημαντικές αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες απέναντι σε διάφορους μεταλλαξιγόνους παράγοντες (Gonzalez de Mejia et al., 1999; Cardador-Martinez et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Το σύστημα μελέτης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης επιλέχθηκε λόγω της συμμετοχής ελευθέρων ριζών στο μηχανισμό μεταλλαξιγένεσης της μπλεομυκίνης. Η μπλεομυκίνη οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\bullet -}$ και $OH^{\bullet}$, οι οποίες επάγουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Hecht, 2000; Burger, 1998). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασε αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε συγκεντρώσεις, ωστοσο, μεγαλύτερες σε σχέση με τις δραστικές συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στις προηγούμενες μεθόδους. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα παρουσίασε σημαντικές ιδιότητες στο να αλληλεπιδρά με τις ρίζες $O_2^{\bullet -}$ και $OH^{\bullet}$ μπορεί να αποτελεί έναν μηχανισμό, με τον

οποίο οι περιεχόμενες ενώσεις αναστέλλουν την ικανότητα της μπλεομυκίνης να προκαλεί σπασίματα στους κλώνους του DNA και στην πρόκληση μεταλλάξεων.

Συνολικά, από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα ψυχανθών παρουσίασαν σημαντικές ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν ως σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται στις ιδιότητές τους οφείλονται στη διαφορετική τους σύσταση σε βιοδραστικές πολυφαινολικές ενώσεις, η οποία οφείλεται στο ότι τα εκχυλίσματα προέκυψαν από διαφορετικά φυτά και τμήματα φυτών, καθώς και στο διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) είχαν τις πιο ισχυρές ιδιότητες στις μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Με βάση τα αποτελέσματα προτείνεται το φυτό *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ως η σημαντικότερη πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Περαιτέρω μελέτες στα πολυφαινολικά βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων και στις ιδιότητές τους σε κυτταρικά συστήματα είναι απαραίτητη. Γι’ αυτό το λόγο το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* επιλέχθηκε για τη μελέτη των χημειοπροστατευτικών του ιδιοτήτων σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα.

Οι παρατηρούμενες ιδιότητες των εκχυλισμάτων αποδίδονται στα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων. Έτσι, με σκοπό την ταυτοποίηση και τη μελέτη των ιδιοτήτων των συστατικών αυτών επιλέχθηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* (κουκιά) και *Lotus edulis* (λώτος), τα οποία, με βάση τις παραπάνω μεθόδους, παρουσίασαν σημαντικές χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Από τα εκχυλίσματα αυτά απομονώθηκαν και εξετάστηκαν για τις βιολογικές τους ιδιότητες 14 πολυφαινολικά κλάσματα. Τα κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* ήταν μείγματα 2-3 πολυφαινολικών ενώσεων σε διαφορετική αναλογία. Αντίθετα, τα κλάσματα του εκχυλίσματος του φυτού *Lotus edulis* ήταν μεμονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις, με εξαίρεση το κλάσμα Le E το οποίο ήταν μείγμα δύο ισομερών της ίδιας ένωσης σε ίση αναλογία (Πίνακας 19).

Στα κλάσματα ταυτοποιήθηκαν 14 πολυφαινολικές ενώσεις, 10 γλυκοσίδια της καιμπφερόλης, 3 γλυκοσίδια της κερκετίνης και 1 ένωση η οποία δεν ανήκε στα φλαβονοειδή (Πίνακας 20). Ως τώρα περισσότερα από 200 γλυκοσίδια καιμπφερόλης έχουν εντοπιστεί σε ποικίλες φυτικές πηγές (Crozier et al., 2006). Ωστόσο, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία πρόσφατα στοιχεία που να καταδεικνύουν την παρουσία αυτού του είδους των φλαβονοειδών στα υπέργεια τμήματα των φυτών *Vicia faba* παρόλο που οι

προανθοκυανιδίνες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στο παρελθόν στα περικάρπια των σπερμάτων (Merghem et al., 2004). Μόλις τα τελευταία χρόνια τα κουκιά (*Vicia faba*) έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως νέα πηγή βιοδραστικών φυτοχημικών ενώσεων (Madar & Stark, 2002). Τα γλυκοσίδια της καιμπφερόλης που ταυτοποιήθηκαν, απομονώθηκαν από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Lotus edulis* για πρώτη φορά. Ωστόσο, παρόμοια γλυκοσίδια φλαβονοειδών έχουν ταυτοποιηθεί στο παρελθόν στο φυτό *Lotus polyphyllos*, ένα άλλο είδος του γένους *Lotus* της οικογένειας των φυτών *Leguminosae* (El-Mousallami et al., 2002).

Με σκοπό τη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων των πολυφαινολικών κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, αρχικά, τα πολυφαινολικά κλάσματα και από τα δύο εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όλα κλάσματα παρουσίασαν ικανότητα να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ η οποία ήταν ισχυρότερη από τα αρχικά εκχυλίσματα (Πίνακας 22). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι τα γλυκοσίδια των φλαβονοειδών, που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα αποτελούν μερικά από τα συστατικά των εκχυλισμάτων που είναι υπεύθυνα για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$. Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, στις οποίες η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών κλασμάτων και των εκχυλισμάτων ψυχανθών από τα οποία απομονώθηκαν, αποδόθηκε στις πολυφαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα (Karamac et al., 2004; Beninger & Hosfield, 2003; Amarowicz & Karamac, 2003). Ακόμη, καθαρά γλυκοσίδια φλαβονολών, παρόμοια με αυτά που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα, έχει αναφερθεί ότι έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες παρόλο που η δράση τους ήταν λιγότερο ισχυρή σε σχέση με τις μη γλυκοσιδικές μορφές τους (Burda & Oleszek, 2001; Heim et al., 2002). Στα φλαβονοειδή και στα φαινολικά οξέα γενικά μειώνει την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες (Ferguson, 2001; Rice-Evans et al., 1996).

Επιπροσθέτως, οι διαφορετικοί συνδυασμοί των πολυφαινολικών συστατικών στα κλάσματα που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* μαζί με τις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ τους, θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις διαφορές που παρατηρούνται στην ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH$^{\bullet}$ μεταξύ των κλασμάτων. Επειδή τα κλάσματα του φυτού *Lotus edulis* αποτελούνται από καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις, ήταν εφικτό να συσχετιστούν τα δομικά τους χαρακτηριστικά με τις παρατηρούμενες αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Γενικά, η αλληλεπίδραση ενός αντιοξειδωτικού με τη ρίζα DPPH$^{\bullet}$ εξαρτάται από τη στερεοχημική

του διαμόρφωση καθώς και από τον αριθμό και τη διαθεσιμότητα των υδροξυλομάδων (Prior et al., 2005). Ακόμη, καθώς οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα *Lotus edulis* είναι γλυκοσίδια καιμφερόλης, παρά τη γλυκοσυλίωσή τους, φέρουν στη δομή τους χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 20). Συγκεκριμένα φέρουν μια υδροξυλομάδα στον δακτύλιο B (C4΄), μια υδροξυλομάδα στη θέση C5 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 4) και διπλό δεσμό μαζί με την οξο-θέση στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου C, τα οποία καθιστούν τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά (Rice-Evans et al., 1996). Το πιο ισχυρό κλάσμα ήταν το Le B (ένωση **13**), το οποίο διαφέρει από το Le O (ένωση **12**) ως προς μια ακετυλομάδα και από τα Le N (ένωση **7**) και Le E (ενώσεις **11a**, **11b**) ως προς το σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο στην υδροξυλομάδα στη θέση του C3 (Πίνακες 20, 22). Φαίνεται ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που φέρει η ένωση **13** την καθιστούν πιο αποτελεσματική απέναντι στη ρίζα DPPH$^{\bullet}$.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων αλλά και απομονωμένων πολυφαινολικών ενώσεων στη δράση των ριζών OH$^{\bullet}$ και ROO$^{\bullet}$. Όμοια με την αντιοξειδωτική ικανότητα, τα αρχικά εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* είχαν μικρότερη προστατευτική δράση σε σχέση με τα κλάσματα που απομονώθηκαν από αυτά (Πίνακας 23). Ακόμη, όμοια με τα αρχικά φυτικά εκχυλίσματα, η προστατευτική δράση των κλασμάτων απέναντι στη δράση των ριζών OH$^{\bullet}$ δεν ήταν τόσο υψηλή όσο εκείνη που παρατηρήθηκε απέναντι στη δράση των ριζών ROO$^{\bullet}$. Όμοιες ιδιότητες με τα πολυφαινολικά κλάσματα παρουσίασαν και οι απομονωμένες πολυφαινολικές ενώσεις (Πίνακας 24).

Όσον αφορά τις καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν, οι προστατευτικές τους δράσεις απέναντι στις ρίζες οφείλονται στα δομικά τους χαρακτηριστικά. Οι 10 από τις 11 πολυφαινολικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν γλυκοσίδια της κερκετίνης και της καιμπφερόλης (Πίνακας 20). Παρά τη γλυκοσυλιωσή τους, οι ενώσεις φέρουν τα κυριότερα χαρακτηριστικά στο βασικό ανθρακικό σκελετό των φλαβονοειδών (Εικόνα 4), που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα οποία είναι πολύ σημαντικά για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996). Η ένωση **3**, που δεν ήταν φλαβονοειδές και δεν έφερε αυτά τα χαρακτηριστικά παρουσίασε και την ασθενέστερη δράση απέναντι στις ρίζες (Πίνακας 24). Ακόμη, η αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με τις ρίζες ROO$^{\bullet}$ παρατηρήθηκε και από προηγούμενες μελέτες στις οποίες φλαβονόλες και γλυκοσίδιά τους, όμοια με τα

εξεταζόμενα, ανέστειλαν την επαγόμενη από ρίζες ROO$^{\bullet}$ οξείδωση της LDL (Hou et al., 2004).

Ως συνέχεια των παραπάνω αποτελεσμάτων και λόγω της ισχυρής ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στη δραστικότητα της ΧΟ, εξετάστηκε και η δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων απέναντι στη δραστικότητά της. Όμοια με τις αντιοξειδωτικές/προστατευτικές ιδιότητες τα πολυφαινολικά κλάσματα και οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις παρουσίασαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τα αρχικά εκχυλίσματα (Πίνακας 25, Γράφημα 7). Η ισχυρότερη ανασταλτική δράση των κλασμάτων και το γεγονός ότι φλαβονόλες όπως η κερκετίνη και η καιμπφερόλη αποτελούν σημαντικούς αναστολείς της ΧΟ (Cos et al., 1998; Nagao et al., 1999) καθιστούν τις πολυφαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα τα υπεύθυνα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων.

Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες ασχολούνται με την αναζήτηση νέων φυσικών αναστολέων στης ΧΟ (Borges et al., 2001). Με βάση την κινητική ανάλυση της δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε ότι όλες παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση στη δραστικότητα της ΧΟ (Πίνακας 26). Με βάση τη χημική τους δομή παρατηρείται ότι οι πιο ισχυρές ενώσεις ήταν γλυκοσίδια της κερκετίνης και της καιμπφερόλης. Η ένωση **3**, η οποία δεν είναι φλαβονοειδές παρουσίασε την ασθενέστερη ανασταλτική δράση (Πίνακες 20, 26). Καθώς πολλά φλαβονοειδή αποτελούν φυσικούς αναστολείς της ΧΟ, η μελέτη της σχέσης δομής-δράσης των φλαβονοειδών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C5 και C7 και ο διπλός δεσμός ανάμεσα στον C2 και C3 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 4) ευνοούν την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών (Cos et al., 1998; Cotelle, 2001). Τα γλυκοσίδια της κερκετίνης και καιμπφερόλης που εξετάστηκαν έχουν το διπλό δεσμό στις θέσεις C2 και C3 και ελεύθερη υδροξυλομάδα στη C5, ωστόσο οι υδροξυλομάδες στις θέσεις C7 και C3 είναι γλυκοσυλιωμένες (Πίνακας 20). Έτσι, τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την ανασταλτική δράση των ενώσεων. Ωστόσο, η γλυκοσυλίωση των υδροξυλομάδων στις θέσεις C7 και C3 μειώνουν την ανασταλτική δράση των ενώσεων καθώς οι αντίστοιχες μη γλυκοσυλιωμένες φλαβονόλες, η κερκετίνη και η καιμπφερόλη παρουσιάζουν πολύ μικρότερες τιμές K_i (0,28 μM και 0,23 μM αντίστοιχα) σε σχέση τις τιμές K_i των ενώσεων (Nagao et al., 1999). Γενικότερα, η υποκατάσταση των υδροξυλομάδων στη θέση C3 και C7 του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών από ένα σάκχαρο ή μια μεθυλομάδα,

μειώνει την ανασταλτική τους δράση απέναντι στην ΧΟ (Cotelle, 2001; Nagao, et al., 1999).

Με βάση τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης, από τις 11 πολυφαινολικές ενώσεις, η ένωση **13** παρουσίασε την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση και ήταν η μόνη που ακολουθούσε το μοντέλο του συναγωνιστικού τύπου αναστολής (Πίνακες 26, 27). Οι υπόλοιπες 10 ενώσεις ακολουθούσαν το μοντέλο του μη συναγωνιστικού τύπου αναστολής και η ένωση **4b** ήταν εκείνη που παρουσίασε την πιο ισχυρή δράση που ακολουθούσε το παραπάνω μοντέλο (Πίνακες 26, 27). Είναι άξιο αναφοράς ότι η ένωση **13** διαφέρει από την ένωση **12** στη χημική δομή ως προς μια ακετυλομάδα (Πίνακας 20), η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για το διαφορετικό τύπο αναστολής των ενώσεων. Ακόμη, η διαφορά της θέσης της υδροξυλομάδας στο επίπεδο στο χώρο μιας υδροξυλομάδας ανάμεσα στις ενώσεις **4a** και **4b** (**4a** κάτω, **4b** επάνω) φαίνεται να επηρεάζει την ισχύ της ανασταλτικής δράσης στην ΧΟ. Ωστόσο, για την πλήρη εξακρίβωση του τρόπου με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή της δραστικότητας της ΧΟ θα πρέπει να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσης των ενώσεων με το ένζυμο. Ακόμη και για τις πολυφαινόλες, για τις οποίες είναι γνωστή η ανασταλτική δράση τους απέναντι στην ΧΟ, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις ως προς τον τύπο αναστολής που ακολουθούν (Cotelle, 2001). Καθώς η κρυσταλλική δομή της ΧΟ έχει προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες (Enroth et al., 2000; Eger et al., 2000) περαιτέρω πειράματα κρυσταλλογραφίας θα προσδιορίσουν τον ακριβή τρόπο και τις θέσεις πρόσδεσης των ενώσεων στο ένζυμο.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από τα κλάσματα των εκχυλισμάτων των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* αποτελούν φυτικούς αναστολείς της ΧΟ. Ωστόσο, η ανασταλτική τους δράση ήταν ασθενέστερη σε σχέση εκείνη της αλλοπουρινόλης, καθώς οι τιμές της σταθεράς K_i ήταν 10 με 1000 φορές χαμηλότερες. Αυτό οφείλεται στο ότι η αλλοπουρινόλη αποτελεί δομικό ανάλογο του υποστρώματος της ΧΟ και είναι εξειδικευμένος συναγωνιστικός αναστολέας της. Παρόλα αυτά η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων στην ΧΟ, αποτελεί το πρώτο στάδιο για την περαιτέρω χημική τροποποίηση των ενώσεων, με σκοπό το σχεδιασμό πιο ισχυρών και πιο εξειδικευμένων φυτικών αναστολέων της ΧΟ, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικοί παράγοντες.

Σχετικά με τις επιδράσεις στην τοποϊσομεράση Ι, τα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* ανέστειλαν την καταλυτική

της δράση σε συγκεντρώσεις 400 και 800 μg/mL (Πίνακας 17). Όμοια με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα κλάσματα παρουσίασαν πιο ισχυρή ανασταλτική δράση από τα αρχικά εκχυλίσματα από τα οποία προέκυψαν, καθώς ήταν δραστικά σε συγκεντρώσεις 20 με 200 μg/mL (Πίνακας 28). Σε προηγούμενες εργασίες τα φλαβονοειδή και τα γλυκοσίδιά τους, όμοια με αυτά που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα, έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I (Constantinou et al., 1995; Webb & Ebeler, 2004). Έτσι, η ισχυρή ανασταλτική δράση των πολυφαινολικών αυτών κλασμάτων είναι ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου αυτά τα συστατικά παρουσιάζουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες και θα μπορούσε να οδηγήσει στη χρησιμοποίησή τους στο σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Περαιτέρω έρευνα στη δράση των καθαρών ενώσεων που απαρτίζουν τα κλάσματα είναι απαραίτητη, καθώς και μελέτη της δράσης τους στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I και II. Για την περαιτέρω χρησιμοποίηση των καθαρών συστατικών ως υποψήφιων φαρμακευτικών παραγόντων είναι απαραίτητα ακόμη η διεξαγωγή ερευνών για τον ακριβή μηχανισμό πρόσδεσης των μορίων στις τοποϊσομεράσες και ο προσδιορισμός των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων τους.

Ακόμη, σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική ικανότητα η ένωση **12** που διαφέρει ως προς μία ακετυλομάδα από την ένωση **13** είχε πιο ισχυρή ανασταλτική δράση (Πίνακας 28, Εικόνα 41). Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι οι ακετυλομάδες πιθανόν να εμπλέκονται και να παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση των ενώσεων με την τοποϊσομεράση I, παρότι ήταν σημαντική για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την ανασταλτική τους δράση στην XO.

Όσον αφορά στην αντιμεταλλαξιγόνο δράση τα εκχυλίσματα, σε αντίθεση με τα κλάσματα που προέκυψαν από το εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* δεν ήταν δραστικά. Το κλάσμα Le B (ένωση **13**) ήταν το πιο ισχυρό ενώ είχε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ανασταλτική δράση στην δραστικότητα της XO. Με βάση τη σύγκριση των δομικών χαρακτηριστικών των φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά που ευνοούν την αντιοξειδωτική ικανότητα (Rice-Evans et al., 1996) είναι όμοια με εκείνα που ευνοούν την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δραστικότητα της XO (Cotelle, 2001) και της τοποϊσομεράσης I (Constantinou et al., 1995) και την ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Heim et al., 2002). Έτσι εκτός από την αλληλεπίδραση με τις ρίζες $O_2^{\bullet -}$ και $OH^{\bullet}$ οι σημαντικές ιδιότητες της ένωσης **13** μπορεί να οφείλονται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά τα ιόντα Fe^{2+} τα οποία συμμετέχουν στη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα στηρίζουν την υπόθεση ότι οι περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις των κλασμάτων είναι τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων. Οι ισχυρότερες ιδιότητες των πολυφαινολικών κλασμάτων οφείλονται στο ότι ο συνδυασμός των πολυφαινολικών ενώσεων μέσα στα εκχυλίσματα δρουν με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με τις καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις στα κλάσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι στα εκχυλίσματα μπορεί να υπάρχουν και άλλες ενώσεις οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν τις ιδιότητες των πολυφαινολών αλλά και στον εμπλουτισμό των κλασμάτων κατά τη διαδικασία εκχύλισής τους. Συμπερασματικά, τόσο τα πολυφαινολικά κλάσματα που προέκυψαν από δύο κοινά φυτά της οικογένειας *Leguminosae* όσο και οι περιεχόμενες πολυφαινόλες τους μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.

4.2. Χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων ψυχανθών σε κυτταρικά συστήματα

Με σκοπό τη συσχέτιση των χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων με τις επιδράσεις τους σε κυτταρικά συστήματα, επιλέχθηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*. Τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες ενώ το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν ένα από τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ψυχανθών που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις τους στην ανάπτυξη και την αντιοξειδωτική άμυνα της καρκινικής κυτταρικής σειράς Hep2 και φυσιολογικών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).

Για τη μελέτη των επιδράσεων των εκχυλισμάτων στα κύτταρα Hep2 επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 100, 400 και 800 μg/mL, στις οποίες παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Πίνακας 31). Από τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας παρατηρήθηκε ότι μόνο το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν κυτταροτοξικό για τα κύτταρα Hep2 σε συγκεντρώσεις >100 μg/mL. Το εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Phaseolus vulgaris* δεν είχε καμία επίδραση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η δράση των εκχυλισμάτων αποδίδεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις, στη συγκέντρωσή τους και τη δραστικότητά τους. Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* έχει μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με αυτό του *Phaseolus vulgaris* (Πίνακας 31).

Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στη συγκέντρωση 100 μg/mL παρουσίασε ισχυρές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Πίνακας 31). Η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση αυτή αποδίδεται σε έναν πολύπλοκο μηχανισμό, ο οποίος μπορεί να σχετίζεται με τις αντιοξειδωτικές και προοξειδωτικές ιδιότητες των περιεχόμενων σε αυτό πολυφαινολικών ενώσεων (Halliwell, 2007; Cotelle, 2001). Ακόμη, μπορεί να οφείλεται στη συγκέντρωση των βιοδραστικών συστατικών του. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές φυτοχημικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων και οι πολυφαινόλες, έχουν ευεργετικές ιδιότητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε υψηλές είναι τοξικές επηρεάζοντας αρνητικά την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Halliwell, 2000, 2007; Son et al., 2008; Mattson, 2008). Σε προηγούμενη μελέτη η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης από χαμηλές συγκεντρώσεις φυτικού εκχυλίσματος αποδόθηκε σε επαγωγή της απόπτωσης ενώ από υψηλές συγκεντρώσεις σε νέκρωση (Saleem et al., 2002).

Η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* στα καρκινικά κύτταρα Hep2 το καθιστά πηγή χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα του εκχυλίσματος να αναστέλλει τη δράση της τοποϊσομεράσης I (Πίνακας 16) υποδεικνύει έναν ακόμη μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης του και καθιστά τα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά του ως πιθανούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να προσδιοριστεί η αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων ή η αύξηση του κυτταρικού θανάτου απλά με τη μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων μετά την ολοκλήρωση της επώασης. Περαιτέρω έρευνες και σε μοριακό επίπεδο απαιτούνται για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος. Ακόμη, απαιτείται μελέτη της δράσης του εκχυλίσματος και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα.

Ποικίλες πολυφαινολικές ενώσεις έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί από διάφορα τμήματα των κοινών φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) και έχουν μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές και τις ιδιότητές τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων (Dong et al., 2007; Diaz-Batalla et al., 2006; Aparicio-Fernandez et al., 2005). Σε προηγούμενη μελέτη ένα μεθανολικό εκχύλισμα περικαρπίου σπερμάτων κοινών φασολιών ανέστειλε την ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και HaCaT (Aparicio-Fernandez et al., 2006), ενώ ένα μεθανολικό εκχύλισμα σπερμάτων επηρέασε την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση (Aparicio-Fernandez et al., 2008). Το εκχύλισμα που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη ήταν υδατικό και προερχόταν από τα υπέργεια τμήματα του φυτού. Από τα αποτελέσματά φαίνεται ότι δεν είναι τόσο δραστικό εξαιτίας της διαφορετικής πολυφαινολικής του σύστασης αλλά και της διαφορετικής κυτταρικής σειράς στην οποία μελετήθηκαν οι επιδράσεις του.

Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων επιλέχθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα 100 μg/mL και τα 800 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*, αντίστοιχα. Τα κύτταρα Hep2 έχουν μελετηθεί για την κυτταροτοξικότητα και το οξειδωτικό στρες μετά από επώαση με φυτικά εκχυλίσματα ή αντιοξειδωτικές ενώσεις (Akatov et al, 2003; Viswanadha et al., 2007). Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό (Εικόνα 32) τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα για 2, 12 και 24 h. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν η TAC, η δραστικότητα της CAT, οι συγκεντρώσεις της GSH, GSSG, και των TBARS ως δείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στη συγκέντρωση 100 μg/mL μείωσε την TAC και τη δραστικότητα της CAT μετά από 2 h επώασης (Γράφημα 10 A, B). Ακόμη, προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS μετά από 12 h επώασης (Γράφημα 11). Αντίθετα, το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* στα 800 μg/mL δεν είχε καμία επίδραση στη δραστικότητα της CAT και στη συγκέντρωση των TBARS σε καμία χρονική στιγμή αλλά μείωσε την TAC μετά από 2 h επώασης (Γραφήματα 12, 13).

Η μείωση της TAC σε συνδυασμό με τη μείωση της δραστικότητας της CAT και την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS αποτελούν ενδείξεις οξειδωτικού στρες. Η TAC είναι ένας γενικός δείκτης, που αντιπροσωπεύει αντιοξειδωτικές ενώσεις και εφαρμόζεται σε ποικίλα δείγματα (Bartosz, 2003). Η TAC βασίστηκε στην ικανότητα των ενώσεων να εξουδετερώνουν τη ρίζα $DPPH^{\bullet}$ (Prior et al., 2005; Jannaszewska & Bartosz, 1984). Ωστόσο, εξαιτίας της γενικής φύσης του δείκτη, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεταβολής του θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με άλλους δείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες (Ghiselli et al., 2000). Με βάση τα αποτελέσματα, στο κυτταροπλασματικό αιώρημα των κυττάρων Hep2 υπάρχουν ενώσεις που έχουν αυτή την ιδιότητα ωστόσο είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η ταυτότητά τους. Η μείωση της TAC υποδεικνύει αύξηση του ενδοκυτταρικού φορτίου σε ελεύθερες ρίζες, το οποίο μπορεί να οδήγησε σε μείωση των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών (Ghiselli et al., 2000; Bartosz, 2003). Ακόμη, η αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS υποδεικνύει αύξηση του ενδοκυτταρικού φορτίου σε ελεύθερες ρίζες, το οποίο οδηγεί στην έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Therond et al., 2000).

Παρά το ότι η TAC και η δραστικότητα της CAT επηρεάστηκαν από τα εκχυλίσματα, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο σύστημα της γλουταθειόνης (Γραφήματα 10, 12). Η σειρά με την οποία ενεργοποιούνται οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί για να αντιμετωπίσουν καταστάσεις οξειδωτικού στρες δεν είναι πλήρως καθορισμένη. Οι κυτταρικές αποκρίσεις εξαρτώνται από τον τύπο του επαγωγέα του οξειδωτικού στρες, το χρόνο έκθεσης των κυττάρων, καθώς και τα συστήματα στα οποία εξετάζονται (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 1998).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στη συγκέντρωση 100 μg/mL που έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δρα προοξειδωτικά στα καρκινικά κύτταρα Hep2 επάγοντας σε αυτά οξειδωτικό στρες. Ανάλογη δράση αλλά λιγότερο ισχυρή έχει και το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus*

subsp. *laxiflorus*, στα πειράματα μελέτης των επιδράσεων στην ενζυμική δραστικότητα της CAT, παρατηρήθηκε ότι ανέστειλε κατά 50% τη δραστικότητά της σε συγκέντρωση 120 μg/mL (Πίνακας 15).

Η επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα Hep2 και η αναστολή της δραστικότητας της CAT από το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* αντικατοπτρίζουν προοξειδωτικές ιδιότητες των περιεχόμενων σε αυτό πολυφαινολικών ενώσεων. Ακόμη, υποδεικνύουν ένα μηχανισμό για την κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος καθώς υψηλό ενδοκυτταρικό φορτίο ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε πρόκληση βλαβών στο DNA και απόπτωση (Mates & Sanchez-Jimenez, 2000; Galati & O'Brien, 2004). Έτσι, η παρατηρούμενη προοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στα καρκινικά αυτά κύτταρα πιθανόν αποτελεί έναν μηχανισμό της κυτταροτοξικής και αντικαρκινικής του δράσης (Hadi et al., 2007; Galati & O'Brien, 2004).

Τα αποτελέσματα δείχνουν τη σημασία των συγκεντρώσεων των βιοδραστικών συστατικών σε διαφορετικά συστήματα. Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* σε συγκέντρωση στην οποία παρουσίαζε σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες προκαλούσε επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Όμοια, το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*, παρά τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση στην εξεταζόμενη συγκέντρωση προκαλούσε ήπια επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Έτσι, τα εκχυλίσματα και τα βιοδραστικά συστατικά τους παρά την αντιοξειδωτική τους δράση, μπορεί μετά από μια κρίσιμη συγκέντρωση να δρουν ως προοξειδωτικά επάγοντας το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα.

Για το λόγω αυτό, στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων σε φυσιολογικά κύτταρα PBMCs, τα οποία βρισκόταν υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH. Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων, τα οποία δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις από 2 μέχρι 800 μg/mL. Το εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν το μόνο κυτταροτοξικό μειώνοντας τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων μετά την ολοκλήρωση της επώασης στις συγκεντρώσεις 50-800 μg/mL (Γράφημα 14). Παρότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* έδειξε σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ήταν κυτταροτοξικό για τα PBMCs. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με μελέτες που έδειξαν ότι πολυφαινολικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα δεν παρουσίασαν καμία κυτταροτοξική δράση στα PBMCs (Rao et al., 2007). Ο συνδυασμός ποικίλων ενώσεων, πέραν των πολυφαινολικών, που υπάρχουν στο εκχύλισμα μπορεί να είναι υπεύθυνος για την κυτταροτοξική δράση του. Ακόμη, όπως παρατηρήθηκε παραπάνω στα κύτταρα

Hep2 στη συγκέντρωση 100 μg/mL το εκχύλισμα οδηγούσε σε επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Μπορεί η κυτταροτοξική του δράση σε συγκεντρώσεις > 50 μg/mL να οφείλεται σε επαγωγή του οξειδωτικού στρες και στα φυσιολογικά PBMCs. Περαιτέρω μελέτη για τον ακριβή μηχανισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* στα PBMCs είναι απαραίτητη.

Για τη μελέτη των επιδράσεων των εκχυλισμάτων στα PBMCs παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH επιλέχθηκαν δύο μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για κάθε εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 5 και 10 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus Laxiflorus* και 400 και 800 μg/mL για το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris*. Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων μελετήθηκαν στο σύστημα της γλουταθειόνης και την TAC των PBMCs παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα, καθώς και απέναντι στην κυτταροτοξική του δράση.

Ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH είναι ένα οργανικό υδροπεροξείδιο και χρησιμοποιείται κυρίως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για τη μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Μελέτες έδειξαν ότι το σύστημα της γλουταθειόνης είναι το πρώτο που επηρεάζεται από τη δράση του t-BOOH (Sies and Summer, 1975; Martín et al., 2000; Lima et al., 2006). Έχει παρατηρηθεί ότι το t-BOOH οξειδώνει την GSH μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Sies and Summer, 1975; Martín et al., 2000; Lima et al., 2006). Ακόμη, αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών $tBO^{\bullet}$ (*tert*-butyl-hydroperoxyl) (Martín et al., 2000; Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες $tBO^{\bullet}$ όσο και η αλληλεπίδραση του t-BOOH με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξείδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Martín et al., 2000; Latour et al., 1995).

Η επώαση του t-BOOH σε συγκέντρωση 80 μM με τα κύτταρα για 2 h δεν ήταν κυτταροτοξική, ωστόσο οδηγούσε σε επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, μείωσε τη συγκέντρωση της GSH και αύξησε τη συγκέντρωση της GSSG κατά 26% και 43%, αντίστοιχα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Παρουσία του t-BOOH μειώθηκε και ο λόγος GSH/GSSG κατά 50% σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, αποτελώντας ένδειξη οξειδωτικού στρες (Cotgreave et al., 1988). Ακόμη, η επώαση με το t-BOOH οδήγησε σε αύξηση κατά 79% της TAC (Γράφημα 15). Με την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα το ενδοκυτταρικό φορτίο των ελευθέρων ριζών αυξάνεται. Παρουσία του t-BOOH παρατηρήθηκε αύξηση της TAC, η οποία αντικατοπτρίζει αύξηση των ενδοκυτταρικών συστατικών με σκοπό την εξουδετέρωση

των ελευθέρων ριζών. Η αύξηση της TAC σε συνδυασμό με τη μείωση του λόγου GSH/GSSG αποτελούν στοιχεία που συνηγορούν στο ότι ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH προκάλεσε οξειδωτικό στρες στα PBMCs.

Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν το μόνο που παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στις επιδράσεις του t-BOOH σε συγκέντρωση 10 μg/mL. Τα ποσοστά της GSH και της GSSG επανήρθαν κατά 91% και 51% αντίστοιχα σε σχέση με τα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα μετά την επώαση με το εκχύλισμα. Ακόμη και ο λόγος GSH/GSSG αυξήθηκε κατά 37% σε σχέση με το θετικό μάρτυρα. Ωστόσο, η TAC που μετρήθηκε μετά την επώαση με το t-BOOH δε μεταβλήθηκε από την παρουσία του εκχυλίσματος (Γράφημα 16). Τα αποτελέσματα αυτά αντικατοπτρίζουν την προστατευτική δράση των συστατικών του εκχυλίσματος απέναντι στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από το t-BOOH. Επειδή τα εκχυλίσματα συν-επωάστηκαν με τον οξειδωτικό παράγοντα χωρίς να προηγηθεί προ-επώαση, η παρατηρούμενη προστατευτική δράση αποδίδεται στην ικανότητα των βιοδραστικών πολυφαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος να εξουδετερώνουν άμεσα τις ρίζες $tBO^{\bullet}$ που παράγονται από το t-BOOH και στην παρεμπόδιση της οξείδωσης GSH (Cotelle, 2001). Ακόμη, επειδή στην τοξική δράση του t-BOOH εμπλέκονται και Fe^{2+} (Martín et al., 2000; Hix et al., 2000), η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των πολυφαινολικών του ενώσεων να δεσμεύουν χηλικά τα Fe^{2+} (Heim et al., 2002; Mira et al., 2002). Σε προηγούμενη μελέτη η προστατευτική δράση της κερκετίνης απέναντι στις τοξικές επιδράσεις του t-BOOH αποδόθηκαν στην ικανότητά της να δεσμεύει χηλικά τα ιόντα σιδήρου, υποστηρίζοντας την παραπάνω υπόθεση (Sentili et al., 1998; Alia et al., 2006).

Σε αντίθεση με το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* δεν παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στις επιδράσεις του t-BOOH. Αντίθετα, το εκχύλισμα παρουσίασε προοξειδωτική δράση, καθώς στη συγκέντρωση 800 μg/mL οδήγησε σε αύξηση κατά 33% της συγκέντρωσης της GSSG παρουσία του t-BOOH σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση της GSH και στο λόγο GSH/GSSG. Ωστόσο, όμοια με το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* η TAC δεν επηρεάστηκε από το εκχύλισμα παρουσία του t-BOOH (Γράφημα 17). Η παρατηρούμενη προοξειδωτική δράση αποδίδεται στην υψηλή συγκέντρωση του εκχυλίσματος (800 μg/mL). Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές φυτοχημικές ενώσεις έχουν ευεργετικές ιδιότητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικές (hormesis) (Halliwell, 2000;

Son et al., 2008; Mattson, 2008). Ακόμη, σε αυτή τη συγκέντρωση οι φαινολικές ρίζες, που παράγονται μετά από την εξουδετέρωση των ριζών tBO$^{\bullet}$, μπορεί να οξειδώνουν την GSH οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Galati et al., 2002).

Όσον αφορά την επίδραση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα του t-BOOH και τα δύο εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση. Το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ήταν το πιο δραστικό, καθώς παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτό του φυτού *Phaseolus vulgaris* (Γράφημα 19). Η δράση αυτή αποδίδεται στο μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος αλλά και στις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητές του. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στην κυτταροτοξική δράση του t-BOOH εμπλέκονται οι επιβλαβείς επιδράσεις ελευθέρων ριζών (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Από τα προηγούμενα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα αναστέλλουν την επαγόμενη από ρίζες ROO$^{\bullet}$ πρόκληση θραυσμάτων στο DNA (Πίνακας 12). Συνεπώς, η προστατευτική δράση που παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα απέναντι στην κυτταροτοξικότητα του t-BOOH μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα περιεχόμενων βιοδραστικών πολυφαινολικών συστατικών τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες tBO$^{\bullet}$. Ακόμη, με βάση το μηχανισμό τοξικής δράσης του t-BOOH επηρεάζεται το σύστημα της γλουταθειόνης (Γράφημα 15). Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η απορύθμιση του λόγου GSH/GSSG όσο και η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωση της GSH εμπλέκονται σε κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με την μεταγωγή σημάτων, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της απόπτωσης σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Ghibelli et al., 1995, 1999; Soltaninassab et al., 2000). Έτσι, η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να εμποδίζουν την οξείδωση της GSH και τη μείωση των επιπέδων της από το t-BOOH. Με βάση τα αποτελέσματα, μόνο το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* συνέβαλε στην επαναφορά των επιπέδων της GSH, της GSSG και του λόγου GSH/GSSG στα επίπεδα του αρνητικού μάρτυρα στη μη κυτταροροξική συγκέντρωση 80 μM του t-BOOH (Γράφημα 16).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στην επαγόμενη κυτταροτοξικότητα του t-BOOH σε χαμηλές συγκεντρώσεις 5 και 10 μg/mL. Το εκχύλισμα αυτό ήταν από τα πιο δραστικά στις μεθόδους που εφαρμόστηκαν για την εκτίμηση των βιολογικών του ιδιοτήτων. Συνεπώς, τα αποτελέσματα στο κυτταρικό σύστημα των PBMCs δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων

που παρατηρήθηκαν στις *in vitro* δοκιμές με τις κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος. Ακόμη, επισημαίνουν τη σημασία της δοκιμής των βιολογικών ιδιοτήτων σε κυτταρικά συστήματα και των δραστικών συγκεντρώσεων σε αυτά, καθώς μετά από κάποια συγκέντρωση τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων μπορεί να δρουν προοξειδωτικά και να είναι τοξικά για τα κύτταρα.

Συνολικά, από τις επιδράσεις των εκχυλισμάτων στα εξεταζόμενα κυτταρικά συστήματα, παρατηρήθηκε ότι, στα καρκινικά κύτταρα Hep2 το υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μg/mL ήταν κυτταροτοξικό και οδηγούσε σε οξειδωτικό στρες. Η παρατηρούμενη κυτταροτοξική και προοξειδωτική δράση στα κύτταρα αυτά καθιστούν το εκχύλισμα σημαντική πηγή χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Παρόλα αυτά με την παρατήρηση των επιδράσεων του συγκεκριμένου εκχυλίσματος στα φυσιολογικά PBMCs παρατηρήθηκε ότι στη συγκέντρωση 100 μg/mL ήταν κυτταροτοξικό για τα PBMCs. Περαιτέρω μελέτη και των επιδράσεων των εκχυλισμάτων σε άλλες φυσιολογικές και καρκινικές σειρές είναι απαραίτητη πριν από τη χρησιμοποίησή τους ως χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Ωστόσο στη συγκέντρωση 10 μg/mL παρουσίασε σημαντική προστατευτική δράση στα κύτταρα PBMCs όταν αυτά βρισκόταν υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες. Καθώς οι ελεύθερες ρίζες είναι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας, η παρατηρούμενη προστατευτική δράση του εκχυλίσματος αποτελεί έναν χημειοπροστατευτικό μηχανισμό.

Συνολικά τα αποτελέσματα προτείνουν το φυτό *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) ως σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών και χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Ωστόσο, πρέπει να υπάρχει προσοχή στον προσδιορισμό των δραστικών και μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 μg/mL μπορεί να έχει προοξειδωτικές ιδιότητες. Ακόμη, το γεγονός ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσίασε σημαντικές χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν εφικτές στον οργανισμό, ενισχύει τη σημασία μελετών για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων του *in vivo*. Περαιτέρω μελέτες στα πολυφαινολικά βιοδραστικά συστατικά του και στις ιδιότητές τους είναι επίσης απαραίτητη.

Γενικό συμπέρασμα

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στο σύνολό τους παρουσιάζει σημαντικά στοιχεία για τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες νέων εκχυλισμάτων από ελληνικά ψυχανθή. Ακόμη, δίνει πληροφορίες για πολυφαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε τμήματα ψυχανθών εκτός των καρπών τους καθώς και σημαντικές βιολογικές ιδιότητες τους. Ακόμη, τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι πρέπει να γίνεται εκτενέστερη μελέτη των δραστικών συγκεντρώσεων βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων σε διάφορα συστήματα, κυτταρικά και μη, ώστε αυτά να χαρακτηριστούν πιθανοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.

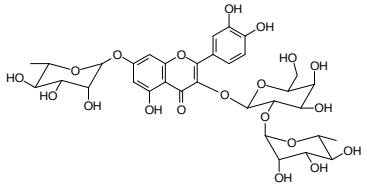
Η παρούσα μελέτη προτείνει εκτός από τη χρησιμοποίηση των εκχυλισμάτων ψυχανθών ως πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων, και ως υποψήφια συμπληρωματικά στοιχεία σε βιολειτουργικά τρόφιμα ιδιαίτερα για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ακόμη, προτείνει το φυτό *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (άγριο είδος λαθουριού) ως τη σημαντικότερη πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Οι παρατηρούμενες ιδιότητές του καθιστούν ενδιαφέρουσα τη μελέτη των χημειοπροστατευτικών του ιδιοτήτων και σε *in vivo* μελέτες.

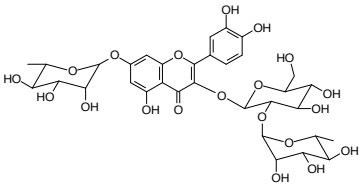
Παράρτημα

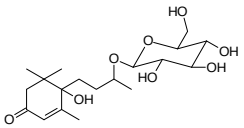
Πίνακας 32: Φυτικά εκχυλίσματα ψυχανθών, κλάσματα και καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη

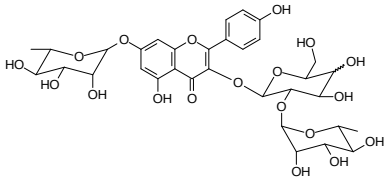
Φυτικά εκχυλίσματα **Ελληνικών ποικιλιών ψυχανθών (*Leguminosae*)**	***Κλάσματα/καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις εκχυλισμάτων***				
	Μεθανολικού εκχ. πόας *Vicia faba*			**Μεθανολικού εκχ. πόας *Lotus edulis*****	
Υδατικά και Μεθανολικά	**Κλάσματα***	**Καθαρές ενώσεις**	**Αναλογία ενώσεων**	**Κλάσματα****	**Καθαρές ενώσεις**
Phaseolus vulgaris (πόα, σπέρματα)	Vf K	5:10:6	(4:1:2)	Le B	13
Vicia faba (πόα)	Vf L	Μείγμα μη πολικών ενώσεων		Le E*	11 ισομορφές (11a, 11b)
Vicia tenuifolia subsp. *stenophylla* (πόα, καρποί)	Vf N	7:8	(2:1)	Le N	7
Lens culinaris (πόα, σπέρματα)	Vf F	3:4	(2:1)	Le O	12
Lupinus albus (πόα, σπέρματα, περικάρπιο)	Vf I	5:6	(1:4)		
Lotus edulis (πόα, καρποί)	Vf P	9:10	(1:1)		
Lotus longisiliquosus (πόα)	Vf B	1:2:3	(3:1:3)		
Tetragonolobus purpureus (πόα, καρποί)	Vf C	1:2	(2:1)		
Lathyrus sativus (πόα)	Vf E	3:4	(3:1)		
Lathyrus clymenum (πόα)	Vf Q	5:10	(2:3)		
Lathyrus laxiflorus subsp. *Laxiflorus* (πόα)					

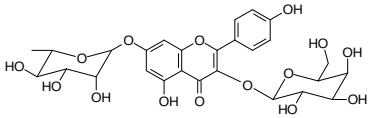
*Μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων; **Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις

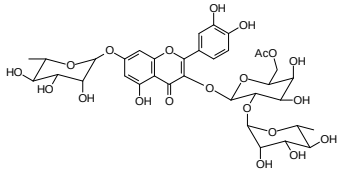

1

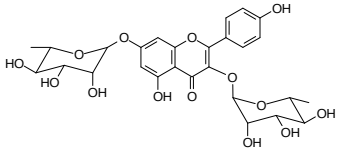

2

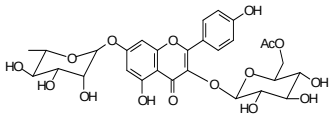

3

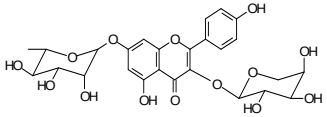

4 (μείγμα ισομορφών)

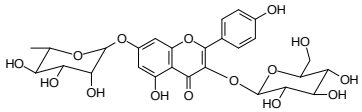

5

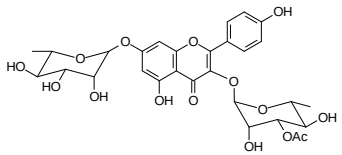

6

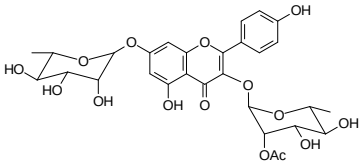

7

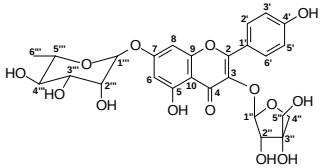

8

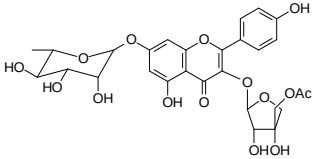

9


10


11a


11b


12


13

Πίνακας 33: Ονόματα των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα που απομονώθηκαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* (κουκιά) και *Lotus edulis* (λώτος)

Καθαρή ένωση	Όνομα της ένωσης	MB*
1	3-*O*-(2-*O*-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη	756,66
2	3-*O*-(2-*O*-ραμνοπυρανοσυλο)-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη	756,66
3	9-*O*-β-D-γλυκοπυρανοσυλοξυ-6-υδροξυ-3-οξο-α-ιονόλη	386
4a, 4b	3-*O*-(2-*O*-ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	740,66
5	3-*O*-γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	594,52
6	3-*O*-γαλακτοπυρανοσυλο-6-*O*-ακετυλο γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη	598,70
7	3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	578,52
8	3-*O*-(6-*O*-ακετυλογλυκοπυρανοσυλο)-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	636,17
9	3-*O*-αραβινοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	564,49
10	3-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	594,52
11a	3-*O*-(3-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	594,52
11b	3-*O*-(2-*O*-ακετυλοραμνοπυρανοσυλο)-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	594,52
12	3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	578,52
13	3-*O*-(5-*O*-ακετυλαπιοφουρανοσυλο)-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη	606

*MB: Μοριακό βάρος της ένωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adlercreutz H. **2003** Phytoestrogenes and breast cancer. *J Ster Biochem Mol Biol* 83: 113-118.

Adlercreutz H., Heinonen S.M., Penalvo-Garcia J. **2004** Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease. *BioFactors* 22: 229-236.

Aebi H. **1984** Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-6.

Akatov V.S., Solov'eva M.E., Leshchenko V.V., Teplova V.V. **2003** Oxidative stress in Hep-2 human laryngeal carcinoma cells induced by combination of vitamins B_{12b} and C. *Bull Exp Biol Med* 136: 279–282.

Aldercreutz H. **2002** Phytoestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 3: 364-373.

Alia M., Ramos S., Mateos R., Bravo L., Goya L. **2005** Response of the antioxidant defense system to *tert*-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol* 19: 119-127.

Alia M.., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. **2006** Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharm* 212: 110-118.

Allkin R., Macfarlance T.D., White R.J., Bisby F.A., Adey M.E. **1983** Names and synonyms of species and subspecies in the Vicieae. Issue 2, Vicieae Database Project Publication No. 2, Southampton.

Amarowicz R., Karamac M. **2003** Antioxidant activity of phenolic fractions of lentil (*Lens culinaris*). *J Food Lipids* 10: 1-10.

Amarowicz R., Pegg R.B. **2008** Legumes as a source of natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 865-878.

Amarowicz R., Piskuła M., Honke J., Rudnicka B., Troszynska A., Kozłowska H. **1995** Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol J Food Nutr Sci* 45: 53-62.

Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. **1975** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test *Mutat Res* 31:347-364.

Andersen Ø.M., Markham K.R. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press Taylor & Francis **2006**.

Anderson J.W., Major A.W. **2002** Pulse and lipaemia, short and long-term effect: Potential in the prevention of cardiovascular diseases. *Br J Nutr* 88: S263-271.

Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. **1999** Cardiovascular and renal benefits of dry beans and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 70: S464-474.

Antunes F., Derick H., Cadenas E. **2002** Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H_2O_2 detoxification in *in vivo* conditions. *Free Rad Biol Med* 33: 1260-7.

Apak R., Guclu K., Ozuyurek M., Karademir S. **2004** Novel total antioxidant capacity index fro dietary polyphenols and vitamin C and E, using cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 52: 7980-7981.

Aparicio-Fernandez X., Garcia-Gasca T., Yousef G.G., Lila M.A., Gonzalez de Mejia E., Loarca-Pina G. **2006** Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *J Agric Food Chem* 54: 2116–2122.

Aparicio-Fernandez X., Reynoso-Camacho R., Castano-Tostado E., Garcia-Gasca T., Gonzalez de Mejia E., Guzman-Maldonado S.H., Elizondo G., Yousef G.G., Lila M.A., Loarca-Pina G. **2008** Antiradical capacity and induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods Hum Nutr* 63: 35-40.

Aparicio-Fernandez X., Yousef G.G., Loparca-Pina G., De Mejia E., Lila M.A. **2005** Characterization of polyphenolics in the seed coat of black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Agric Food Chem* 53: 4615-4622.

Armstrong D. **2002** Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. Humana Press.

Arnao M.B., Cano A., Alcolea J.F., Acosta M. **2001** Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem Anal* 12:138-143.

Arts I.C.W., Hollman P.C.H. **2005** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: S317-25.

Aruoma O.I. **2003** Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut Res* 523-524: 9-20.

Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Giganti D. **2006** Carcinogenic and anticarcinogenic food components. Taylor & Francis Group.

Baily C. **2000** Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 7: 38-58.

Bandele O.J., Clawson S.J., Osheroff N. **2008** Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement. *Chem Res Toxicol* 21: 1253-1260.

Barnes S., Boersma B., Patel R., Kirk M., Darley-Usmar V.M., Kim H., Xu J. **2000** Isoflavonoids and chronic desease: Mechanism of action. *Biofactors* 12: 209-215.

Bartosz G. **2003** Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem* 37: 219-292.

Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. **1998** Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. *Biochem Mol Biol Int* 46: 519-528.

Bazzano L.A., He J., Ogden L.G., Loria C., Vupputuri S., Myers L., Whelton P.K. **2001** Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Arch Intern Med* 161: 2573-8.

Bell S.J., Sears B. **2003** Low-glycemic-load diets: Impact on obesity and chronic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 357-377.

Beniger C.W., Hosfield G.L. **2003** Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris L.* seed coat color genotypes. *J Agric Food Chem* 51: 7879-7883.

Bidlack W.R., Omaye S.T., Meskin M.S., Topham D.K.W. **2000** Phytochemicals as bioactive agents. CRC Press.

Black H.S. **2004** The mechanisms of pro- and antioxidation. *J Nutr* 134: S 3169-3170.

Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. **2003** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan* 91: 179-194.

Borges F., Fernandes E., Roleira F. **2002** Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Cur Med Chem* 9: 195-217.

Bors W., Michel C. **2002** Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957: 57-69.

Bradford M.M. **1976** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Branca F., Lorenzetti S. **2005** Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr* 50: 100-111.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. **1995** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28:25-30.

Bravo L., Manas E., Saura-Calixto F. **1993** Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: effects on faecal weight, and protein and fat excretion. *J Sci Food Agric* 63: 63-68.

Breinhold V., Lauridson S.T., Dragsted L.O. **1999** Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolising and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 29: 1227-1240.

Burda S., Oleszek W. **2001** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49: 2774-2779.

Burdon R.H. **1995** Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18: 775-94.

Burger R. M. **1998** Cleavage of nucleic acids by bleomycin. *Chem Rev* 98:1153-1169.

Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S. **1999** Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424: 9-21.

Campos-Vega R., Loarca-Piña G., Oomah B.D. **2010** Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res Intern* 43: 461-482.

Cano A., Hernández-Ruíz J., García-Cánovas F., Acosta M. **1998** An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* 9:196-202.

Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. **1993** Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad Biol Med* 14: 303-311.

Cao G., Sofic E., Prior R.L. **1997** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med* 22: 749-760.

Cardador-Martinez A., Castano-Tostado E., Loarca-Pina G. **2002** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit Contamin* 19: 62-69.

Cardador-Martinez A., Loarca-Pina G., Dave Oomah B. **2002** Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Agric Food Chem* 50: 6975-6980.

Cassidy A., Albertazzi P., Lise Nielsen I., Hall W., Williamson G., Tetens I. **2006** Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in postmenopausal women. *Proc Nutr Soc* 65: 76-92.

Cavalli L.R., Liang B.D. 1998 Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? Mutat Res 398: 19–26.

Cederroth C.R., Nef S. **2009** Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* 304: 30-42.

Cerutti P.A., 1985 Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-81.

Champ M.M.J. **2002** Non-nutrient bioactive substances of pulses. *Br J Nutr* 8: S307-319.

Chan T., Galati G., O'Brien P.J., **1999** Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones or flavanones *Chem Biol Interact* 122: 15-25.

Chance B., Sies H., Boveris A. **1979** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. **2001** Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.

Chang W.W., Yu C.Y., Lin T.W., Wang P.H., Tsai, Y.C. **2006** Soyasaponin I decreases the expression of alpha2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 614–619.

Cheran M. **1980** Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit Rev Food Sci* 13: 297-335.

Choung M.G., Choi B.R., An Y.N., Chu Y.H., Cho Y.S. **2003** Anthocyanidin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 51: 7040- 7043.

Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H.K. **2002** Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem Soc* 366: 653-661.

Chung K., Wong T.Y., Wei C., Huang Y.W., Lin Y. **1998** Tannins and human health: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38: 421-464.

Collins A.R. **2005** Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr* 81: S261-7.

Constantinou A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R. **1995** Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58: 217-225.

Constantinou A., Stoner G.D., Mehta R., Rao K., Runyan C., Moon R. **1995** The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases *in vitro*. *Nutr Cancer* 23: 121-130.

Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. **2003** Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Curr Med Chem* 10: 1345-1359.

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D. **1998** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61:71-76.

Cotelle N. **2001** Role of flavonoids in oxidative stress. *Cur Top Med Chem* 1: 569-590.

Cotgreave I.A., Gerdes R.G. **1998** Recent trends in glutathione biochemistry glutathione- protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 242: 1-9.

Cotgreave I.A., Moldeus P., Orrenius S. **1988** Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 189-212.

Coward L., Barnes N.C., Setchell K.D.R., Barnes S. **1993** The antitumor isoflavones, genistein and daidzein, in soybean foods of American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.

Cox H.C., Dawdzik J.B., Budzinski E.E. **2001** Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Rad Biol Med* 7: 856-868.

Crapo J.D., Oury T., Rabouille C., Slot J.W., Chang L.Y. **1992** Copper, zinc superoxide dismutase is primarily *α* cytosolic protein in human cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 10405-10409.

Crowell J.A. **2005** The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. *Eur J Cancer* 41: 1889-1910.

Crozier A., Burns J., Aziz A.A., Stewart A.J., Rabiasz H.S., Jekins G.I. **2000** Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol Res* 3: 79-88.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Puplishing **2006**.

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. **2009** Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Reports* 26: 1001-1043.

Cubero J.I. 1981 Origin, taxonomy and domestication. In Webb C., Hawtin G. (eds) Lentils pp. 15-38. CAB International UK.

Das U.N. **2002** A radical approach to cancer. *Med Sci Monit* 8: 79-92.

De Flora S., Ferguson L. **2005** Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut Res* 591: 8-15.

De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R.M., Noonanc D., Albini A. **2001** Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mut Res* 480-481: 9-22.

Deshpande S.S., Campbell C.G. **1992** Genotype variation in BOAA, condensed tannins, phenolics and enzyme inhibitors in grass pea (*Lathyrus sativus)*. *Can J Plant Sci* 72: 1037-1047.

Díaz-Batalla L., Widholm J.M., Fahey G.C., Castaño-Tostado E., Paredes-López O. **2006** Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 54: 2045-2052.

Dieterich S., Bieligk U., Beulich K., Hasenfuss G., Prestle J. **2000** Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101:33-39.

Dixon R.A., Ferreira D. **2002** Genistein. *Phytochem* 60: 205-211.

Dixon R.A., Summer L.W. **2003** Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol* 131: 878-885.

Dizdarglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. **2002** Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurment. *Free Rad Biol Med* 32: 1102-1115.

Dong M., He X., Liu R.H. **2007** Phytochemicals of black bean seed coats: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidative activities. *J Agric Food Chem* 55: 6044-6051.

Dorr R.T. **1992** Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol* 19:3-8.

Dragsted L.O. **2003** Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 112-119.

Duane W.C., **1997** Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans. *J Lipid Res* 38: 1120-28.

Dueñas M., Estrela I., Hernández T. **2004** Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *Eur Food Res Technol* 219: 116–123.

Dueñas M., Hernández T., Estrella I. **2002** Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Eur Food Res Technol* 215: 478-483.

Dueñas M., Hernandez T., Estrella I. **2006** Assesment of *in vitro* antioxidant capacity of the seed coat extract and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic content. *Food Chem* 98: 95-103.

Dueñas M., Sun B., Hernández T., Estrella I., Spranger M.I. **2003** Proanthocyanidin composition in the seed coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). *J Agric Food Chem* 51: 7999-8004.

Duranti M. **2006** Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77: 67-82.

Duranti M., Gius Cr. **1997** Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Res* 53: 31-45.

Eger B.T., Okamoto K., Enroth C., Sato M., Nishino T., Pai E.F., Nishino T. **2000** Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase isolated from bovine milk. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56: 1656-8.

El-Mousallami A.M., Afifi M.S., Hussein S.A. **2002** Acylated flavonol diglucosides from *Lotus polyphyllos*. *Phytochem* 60: 807-11.

Enroth C., Eger B.T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T., Pai E.F. **2000** Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10723-8.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. **2002** Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition*, 18:872-879.

Ferguson L.R. **2001** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mut Res* 475: 89-111.

Fernandez-Orozco R., Zielinski H., Piskuła M.K. **2003** Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds. *Nahrung/Food* 47: 291-299.

Flight I., Clifton P. **2006** Cereals grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: A review of literature. *Eur J Clin Nutr* 60: 1145-1159.

Fraga C.G. **2007** Plant polyphenols: How to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life* 59: 308-317.

Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M.P.M. **2006** New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 26: 747-66.

Froelich-Ammon S.J., Osheroff N. **1995** Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biochem Chem* 270: 21429-21432.

Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P.J. **1999** Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidise-catalysed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 12: 521-525.

Galati G., Teng S., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J. **2000** Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metab Drug Interact* 17: 311-349.

Galati O.G, O'Brien P.J. **2004** Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Rad Biol Med* 37: 287-303.

Galati O.G., Sabzevari J.X., Wilson P.J., O'Brien **2002** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91-104.

Gao R., Yuan Z., Zhao Z., Gao X. **1998** Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 45:41–5.

Geil P.B., Anderson J.W. **1994** Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J Am College Nutr* 13: 549-558.

Ghibelli L., Coppola S., Fanelli C., Riollo G., Civitareale P. **1999** Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 13: 2031-36.

Ghibelli L., Coppola S., Roillio G., Lafavia E., Maresca V., Ciriolo M.R. **1995** Nonoxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 313-20.

Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. **2000** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med* 29: 1106-1114.

Gomez-Cabrera M.C., Borrás C., Pallardó F.V., Sastre J., Ji L.L., Vina, J. **2005** Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567: 113-120.

Gonzalez de Mejia E., Castano-Tosado E., Loarca-Pina G. **1999** Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mut Res* 441: 1-9.

Gonzalez de Mejia E., Chandra S., Ramirez-Mares M. V., Wang W. **2006** Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia sompressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* 44: 1191-1203.

Grey C.E., Aldlecreutz P. **2003** Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 527:27–36.

Guéguen J., Cerletti P. **1994** Proteins of some legume seeds, soybean, pea, fababean and lupin. In: Hudson BJF, editor. New and developing sources of food proteins. New York: Chapman and Hall 145.

Guyton K.Z., Kensler T.W. **1993** Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Br Med Bull* 49: 523-544.

Hadi S.M., Asad S.F., Singh S., Ahmad A. **2000** Putative mechanism of anticancer and apoptosis-inducing properties of plant derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 50: 167-171.

Hadi S.M., Bhat S.H., Azmi A.S., Hanif S., Shamim U., Ullah M.F. **2007** Oxidative breakage for cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Sem Cancer Biol* 17: 370-376.

Hagerman A.E., Riedl K.M., R.E. Rice **1999** Tannins as biological antioxidants. *Basic Life Sci* 66: 495-505.

Hail Jr.N., Cortes M., Drake E.N., Spallholz J.E. **2008** Cancer chemoprevention: A radical perspective. *Free Rad Biol Med* 45: 97-110.

Halliwell B. **1996** Uric acid: an example of antioxidant evaluation In Handbook of Antioxidants. Cadenas E., Packer L. Edition Marcel Dekker, Inc, New York.

Halliwell B. **2000** The antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-80.

Halliwell B. **2001** Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.

Halliwell B. **2007** Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiov Res* 73: 341-347.

Halliwell B., Gutteridge M.C. **1998** Free radicals in biology and medicine. *Oxford Science Publications* Third Edition.

Halliwell B., Whiteman M. **2004** Measuring reactive oxygen species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharm* 142: 231-255.

Hansch C., McKarns S.C., Smith C.J., Doolittle D.J. **2000** Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 127: 61-72.

Hawkins C.L., Morgan P.E., Davies M.J. **2009** Quantification of protein modification by oxidants. *Free Rad Biol Med* 46: 965-988.

Hecht S.M. **2000** Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* 63:158-168.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. **2002** Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.

Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Romani A. **2005** Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris L*. dry beans. *J Agric Food Chem* 53: 3053-3056.

Herlich P., Bohner F.D. **2000** Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 59: 35-41.

Higdon J.V., Frei B. **2003** Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 89-143.

Hill G.D. **2003** Plant antinutritional factors. *Elsevier Science* 4578-4587.

Hille R. **2006** Structure and function of xanthine oxidoreductase. *Eur J Inorg Chem* 10: 1905-2095.

Hix S., Kadisiska M.B., Mason R.P., Augusto O. **2000** *In vivo* metabolism of *tert*-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methyrlation studies. *Chem Res Toxicol* 13: 1056-1064.

Hodnick W.F., Duval D.L., Pardini R.S. **1994** Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem Pharmacol* 47: 573-580.

Hollman P.C.H., Katan M.B. **1999** Dietary flavonoids: Intake, health Effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37: 937-942.

Hong W.K., Sporn M.B. **1997** Recent advances in chemoprevention of cancer. Science 278: 1073-1077.

Hou L., Zhou B.,Yang L., Liu, Z.L. **2004** Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. *Chem Phys Lipids* 129: 209-19.

Humfrey C.D.N **1998** Phytoestrogens and human health effects: Weighing up the current evidence. *Nat Toxins* 6: 51-59.

Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C. **2003** Radical causes of cancer. *Nat Rev* 3: 276-285.

Huyghe C. **1997** White lupin (*Lupinus albus* L.) *Field Crops Res* 53: 147-160.

Hwang E.S., Kim G.H. **2007** Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology* 229: 1-10.

Ibrahim L.F., Kawashty S.A., El-Hagrassy A.M., Nassar M.I., Mabry T. J. **2008** A new kaempferol triglycoside from *Fagonia taeckholmiana*:cytotoxic activity of its extracts. *Carbohydrate Res* 343: 155-158.

Jackson M.J. **1999** An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 58: 1001-1006.

Janaszewska A., Bartosz G. **2002** Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62:231-6.

Ji L.L., **1999** Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exper Biol Med* 222: 283-292.

Johnson I.T. **2007** Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc* 66: 207-15.

Jones D.P., Eklow L. Thor H., Orremus S. **1981** Metabohsm of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes. Relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposttion of endogenously generated H_2O_2. *Arch Biochem Biophys* 210: 505-516.

Kalogeropoulos N., Chiou A., M. Ioannou, Karathanos V.T., Hassapidou M., Andrikopoulos N.K. **2010** Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols,tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chem* 121: 682-690.

Karamac M., Amarowicz R., Weidner S., Shahidi F. **2004** Antioxidant activity of phenolic fractions of white bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Food Lipids* 11: 165–177.

Kaur I.P., Geetha T. **2006** Screening methods for antioxidants-A review. *Min Rev Med Chem* 6: 305-312.

Keilin D., Hartree E.F. **1934** Inhibitors of catalase reaction. *Nature* 134: 933.

Keles M.S., Taysi S., Sen N., Aksoy H., Akcay F. **2001** Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28:141-3.

Kelley W.N., Beardmore T.D. **1970** Allopurinol: alteration in pyrimidine metabolism in man. *Science* 169: 388-390.

Kelloff G.J., Crowell J.A., Steele V.E., Lubet R.A., Malone W.A., Boone C.W., Kopelovich L., Hawnk E., Lieberman R., Lawrence J.A., Ali I., Viner J.L., Sigman C.C. **2000** Progress in cancer chemoprevention agents: Development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 130: S467-471.

Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. Cancer chemoprevention. Promising cancer chemopreventive agents. Vol 1. Humana Press **2004**.

Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention. Vol 2. Humana Press **2005**.

Kelloff G.J., Johnson J.J., Crowell J.A., Boone C.W., DeGeorge J.J., Steele V.E., Mehta M.U., Temeck J.W., Schmidt W.J., Burke G., Greenwald P., Temple R.J. **1995** Approaches to the

development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 1-10.

Kerry N., Abbey M. **1998** The isoflavone genistein inhibits copper and peroxyl radical mediated low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis* 140: 341-347.

Keum Y.S., Park K.K., Lee J.M., Chun K.S., Park J.H., Lee S.K., Kwon H., Surh Y.J. **2000** Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 150:41-8.

Klaunig J.E., Kamendulis L.M. **2004** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-67.

Kohen R., Nyska A. **2002** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30: 620-650.

Korus A., Lisiewska Z., Kmiecik W. **2002** Effect of freezing and canning on the content of selected vitamins and pigments in seed of two grass pea (*Lathyrus sativus* L.) cultivars at the not fully mature stage. *Nahrung/Food* 46: 233–237.

Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. **2002** Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113: S71-88.

Kroon P.A., Clifford M.N., Crozier A., Day A.J., Donovan J.L., Manach C., Williamson G. **2004** How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am Soc Clin Nutr* 80: 15-21.

Kruk I., Aboul-Enein H.Y., Michalska T., Lichszteld K., Kładna A. **2005** Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20:81-9.

Kudoda Y., Hara Y., **1999** Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mut Res* 436: 69-97.

Kuhnau J., **1976** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-91.

Kurlovich B.S., Repyev S.I. **1995** The gene bank and breeding of grain legumes. *N I Vav Instit Plant Ind* 111: 438.

Kurzer M.S., Xu X. **1997** Dietary phytoestrogens. *Ann Rev Nutr* 17: 353-381.

Kushi L.H., Meyer K.A., Jacobs Jr D.R. **1999** Cereals, legumes and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 70: S451-458.

Lajolo F.M., Finardi-Filho F., Menezes, E.W. **1991** Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* beans. *Food Techn* 45: 119–121.

Lajolo F.M., Genovese M.I. **2002** Nutritional significance of lectin and enzyme inhibitors from legumes. *J Agric Food Chem* 50: 6592–6598.

Lambert J.D., Hong J., Yang G.Y., Liao J., Yang C.S. **2005** Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 81: S284-291.

Latour I., Demoulin J.B., Buc-Calderon P. **1995** Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters* 373: 299-302.

Laughton M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Hoult J.R.S., Halliwell B. **1991** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability. *Biochem Pharmacol* 42: 1673-1681.

Le Marchand L. **2002** Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother* 56: 296-301.

Leterme P. **2002** Recommendations by health organizations for pulse consumption. *Br J Nutr* 88: S239-42.

Levin D.E., Marnett L.J. Ames B.N. **1984** Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc Nal Acad Sci* 81:4457-4461.

Levine R.L., Garland G., Olivier C.N., Amici A., Climent I., Lenz A. **1990** Determination of carbonyl content of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186: 464-478.

Lim, P., Wuenschell G.E., Holland V., Lee D.H., Pfeifer G.P., Rodriguez H., Termini J. **2004** Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry* 43: 15339-48.

Lima C.F. **2006** Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79; 2056-2068.

Lin C.C., Wu S.J., Wang J.S., Yang J.J., Chang C.H. **2001** Evaluation of the antioxidant activity of legumes. *Pharm Biol* 39: 300-304.

Lin P.Y., Lai H.M. **2006** Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *J Agric Food Chem* 54: 3807-3814.

López-Amorós M.L., Hernández T., Estrela I. **2006** Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J Food Comp Anal* 19: 277-283.

Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Toro M.V., Ayuso M.J. **2002** Flavonoids as DNA topoisomerase I poisons. *J Enzym InhibMed Chem* 17: 25-29.

Madar Z., Stark A.H. **2002** New legume sources as therapeutic agents. Br J Nutr 88: S287-292.

Madhujith T., Amarowicz R., Shahidi F. **2004** Phenolic antioxidants in beans and their effects on inhibition of radical induced DNA damage. *J Am Oil Chem Soc* 81: 691- 696.

Madhujith T., Naczk M., Shahidi F. **2004** Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Lipids* 11: 220-233.

Magee P.J., Rowland I.R. **2004** Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91: 513-531.

Manach C., Mazur A., Scalbert A. **2005** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 16: 77-84.

Manach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C., Remesy C. **2003** Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* 57: 235-242.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. **2004** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727- 47.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. **2005** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies *Am J Clin Nutr* 81: S230-42.

Manson M.M., Gescher A., Hudson E.A., Plummer S.M., Squires M.S., Prigent S.A. **2000** Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents *Toxicol Letters* 112–113: 499–505.

Marnett L.J. **2000** Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-70.

Marnett L.J. **2002** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182: 219-222.

Martín C., Martínez P., Navarro R., Ruiz-Sanz J.I., Lacort M., Ruiz-Larrea M.B. **2000** *Tert*-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem Pharm* 62: 705–712.

Masters C., Pegg M., Cranc D. **1986** On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70: 113-120.

Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. **2000** Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 157–170.

Mathers J.C. **2002** Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br J Nutr* 88: S273-9.

Mattson M.P. **2008** Dietary factors, hormesis and health. *Age Res Rev* 7: 43-48.

Mazur W.M., Duke J.A., Wähälä K., Rasku S., Adlercreutz H. **1998** Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *J Nutr Biochem* 9: 193-200.

McCord J.M., Fridovich I. **1968** The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243: 5753-5760.

McCord J.M., Fridovich I. **1969** Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2-14: 6049-6055.

Meister A., Anderson M.E. **1983** Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-60.

Merghem R., Jay M., Brun N., Voirin B. **2004** Qualitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from *Vicia faba*. *Phytochem Anal* 15: 95-9.

Meskin M.S., Bidlack W.R., Davies A.J., Omaye S.T. **2002** Phytochemicals in nutrition and health. CRC Press.

Messina M., Barnes S. **1991** Workshop report from the Division of Cancer Etiology, National Cancer Institute, National Institutes of Health. The role of soy products in reducing risks of certain cancers. *J Natl Cancer Inst* 83: 541–546.

Messina M., Persky V., Setchell K.D.R., Barnes S. **1994** Soy intake and cancer risk: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* 21: 113-131.

Messina M.J. **1999** Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 70: S439-450.

Michiels C., Raes V., Toussaint O., Remacle J. **1994** Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 17: 235-248.

Milgate J., Roberts D.C.K. **1995** The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr Res* 15: 1223-1249.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. **1993** A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-12.

Minihane A., Rimbach N. **2002** Gerald iron absorption and the iron binding and antioxidant properties of phytic acid. *Inter J Food Sci Tech* 37: 741–748.

Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R. **2002** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad Res* 36: 1199-1208.

Moridani M.J., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. **2002** Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Rad Biol Med* 34: 243-253.

Mortelmans K., Zeiger E. **2000** The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455:29-60.

Murphy P.A., Hendrich S. **2002** Phytoestrogens in foods. *Adv Food Nutr Res* 44: 195-246.

Mylonas C., Kouretas D. **1999** Lipid Peroxidation and tissue Damage. *In Vivo* 13: 295-310.

Nagao A., Seki M., Kobayashi H. **1999** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosc Biotech Biochem* 63: 1787-1790.

Nelson S.K., Bose S.K., Grunwald G.K., Myhill P., McCord J.M. **2006** The induction of human superoxide dismutase and catalase *in vivo*: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Rad Biol Med* 40: 341-347.

Nguyen T., Sherratt P.J., Pickett C.B. **2003** Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-260.

Nichenamentla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J.H. **2006** A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 161-183.

Nijveldt R.J., Els van Nood D., EC van Hoorn P.G., Boelens K., van Norren P., AM van Leeuwen **2001** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications *Am Soc Clin Nutr* 74: 48-25.

Niki E. **1990** Free radical initiators as source of water or lipid-soluble peroxyl radicals. *Methods Enzymol* 186:100-8.

O'Brien P.J. **2000** Peroxidases. *Chem Biol Interact* 129: 113-139.

Olson J.S., Ballou D.P., Palmer G., Massey V. **1974** The mechanism of action of xanthine oxidase. *J Biol Chem* 249:4363-382.

Oomah B.D., Cardador-Martinez A., Loarca-Pina G. **2005** Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Sci Food Agric* 85: 935-942.

Oury T.D., Day B.J., Crapo J.D. **1996** Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75: 617-636.

Pacher P., Nivorozhkin A., Szabó C. **2006** Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 58:87-114.

Park D., Huang T., Frishman W.H. **2005** Phytoestrogenes as cardiopreventive agents. *Cardiology* 13: 13-17.

Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. **2000** Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J Agric Food Chem 48: 5331-5337.

Pastor-Cavada E., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M., Vioque J. **2009** Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild Lathyrus species from South Spain. *LWT Food Sci Technol* 42: 705-709.

Pastor-Cavada E., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M., Vioque J. **2010** Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus*. Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chem in press*.

Perron N.R., Brumaghim J.L. **2009** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53: 75-100.

Pommier Y. **1993** DNA topoisomerase I and II in cancer chemopathy: update and perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 103-108.

Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D. **1998** Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochem Biophys Acta* 1400: 83-106.

Postova J., Lasovsky J., Vicar J. **2003** Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Papers* 147: 147-153.

Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc 2000; 58: 1025-33.

Prior R.L., Wu X., Schaich K. **2005** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. **2000** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 48: 3396-3402.

Prajda N., Webe, G. **1975** Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 59: 245-249.

Ramos S. **2007** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 18: 427-442.

Rao Y.K., Geethangili M., Fang S.H., Tzeng Y.M. **2007** Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food Chem Toxicol* 45: 1770–1776.

Rechner A.R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G.P., Moore K.P., Rice-Evans C.A. **2002** The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad Biol Med* 33: 220-235.

Reddy L., Odhav B., Bhoola K. D. **2003** Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 99: 1-13.

Reed J.D. **1995** Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Animal Sci* 73: 1516-1528.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. **2003** Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23: 519-534.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. **1996** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20: 933-956.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. **1997** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Rev* 2: 152-159.

Rizkalla S.W., Bellisle F., Slama G. **2002** Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulse in diabetic patients and healthy individuals. *Br J Nutr* 88: S255-262.

Rochfort S., Panozzo J. **2007** Phytochemicals for health, the role of pulses. *J Agric Food Chem* 55: 7981-7994.

Rodriguez H., Valentine M.R., Holmquist G.P., Akman S.A., Termini J. **1999** Mapping of peroxyl radical induced damage on genomic DNA. *Biochemistry* 38: 16578-88.

Saini H.S. **1989** Legume seed oligosaccharides; *Recent Adv Res Antinutr Factors Legume Seeds*, Proc. Int. Workshop, 1988; Huisman J., Van der Poel T. F.B., Liener I.E., Eds.; Pudoc: Wageningen, Neth, 329–341.

Saini H.S., Knights E.J. **1984** Chemical constitution of starch and oligosaccharide components of 'desi' and 'kabuli' chickpea (*Cicer arietinum*) seed types. *J Agric Food Chem* 32: 940–944.

Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. **2002** Plant phenolic antioxidants and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicol* 177: 67-80.

Saleem A., Husheem M., Harkonen P., Pihlaja K. **2002** Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *J Ethnopharmacol* 81: 327–336.

Sanchez-Moreno C. **2002** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* 8: 121-137.

Sandberg A.S. **2002** Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr* 88: S281-285.

Santos-Buelga C., Scalbert A. **2000** Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* 80: 1094-1117.

Sarkar F.H., Li Y. **2002** Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metast Rev* 21: 265-280.

Saura-Calixto F., Serrano J., Gon I. **2007** Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chem 101: 492–501.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. **2005** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.

Scalbert A., Morand C., Manach C., Remesy C. **2002** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56: 276-282.

Scalbert A., Williamson G. **2000** Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J Nutr* 130: 2073s-2085s.

Schafer F.Q., Buettner G.R. **2001** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 30: 1191-212.

Seifried H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A. **2007** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Chem* 18: 567-579.

Serrano J., Goni I., Saura-Calixto F. **2007** Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res Intern* 40: 15-21.

Sestili P., Guidarelli A., Dachá M., Cantoni O. **1998** Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by *tert*-butyl hydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Rad Biol Med* 25: 196-200.

Setchell K.D.R. **1998** Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68: S1333-1346.

Setchell K.D.R., Cassidi A. **1999** Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: S758-767.

Shi J., Arunasalam K., Yeung D., Kakuda Y., Mittal G., Jiang Y. **2004** Saponins from edible legumes: chemistry, processing and health benefits. *J Med Food* 7: 67-78.

Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E., Mack T.M. **1991** Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63: 963-966.

Shukla Y., Kumar Pal. S. **2004** Dietary cancer chemoprevention: An overview. *Inter J Hum Gen* 4: 265-276.

Shureiqi I., Reddy P., Brenner D.E. **2000** Chemoprevention: general perspective. *Crit Rev Oncol Hem* 33: 157-167.

Sies H. **1985** Oxidative stress: introductory remarks. In Oxidative Stress ed. H Sies. Academic Inc. (Inserts 1, 2).

Sies H., Summer K.H. **1975** Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur J Biochem* 57: 503-512.

Simopoulos A.P. **2001** The Mediterranean Diets: What Is So Special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. *J Nutr* 131: S3065-3073.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. **1999** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178.

Sirtori C.R. **2001** Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Safety* 24: 665-682.

Slater A.F., Stefan C., Nobel I., van den Dobbelsteen D.J., Orrenius S. **1995** Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82-83: 149-53.

Slavin J.L. **2005** Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21: 411-418.

Smil V. **1997** Some unorthodox perspectives on agricultural biodiversity. The case of legume cultivation. *Agric Eco Environ* 62: 135-144.

Smith J.J., Tully P., Padberg R.M. **2005** Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy. *Sem Oncol Nurs* 21: 243-251.

Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg DM. **1997** Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11: 287-313.

Soltaninassab S.R., Sekhar K.R., Meredith M.J., Freemen M.L. **2000** Multifaceted regulation of γ-glutamylcysteine synthase. *J Cell Physiol* 182: 163-70.

Son T.G., Camandola S., Mattson M.P. **2008** Hormetic dietary phytochemicals. *Neurmol Med* 10: 236–246.

Spallholz J.E., Boylan L.M. **1991** Glutathione peroxidase. The two selenium enzymes. In Everse J., Everse K.E., Grisham M.B. eds. Peroxidases in chemistry and biology. Vol I. Boca Raton F.L CRC Press 259-291.

Sporn M.B. **1976** Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res* 36: 2699-2702.

Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos K., Kouretas D. **2005** Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15:1013-22.

Stoner G.D., Morse M.A., Kelloff G.J. **1997** Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ Health Perspect* 105: S945-954.

Sun S.Y., Hail N., Lotan R. **2004** Apoptosis as a novel target of cancer chemoprevention. *J Nat Cancer Inst* 69: 662-669.

Surh Y.J. **2003** Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768–80.

Tharanathan R.N., Mahadevamma S. **2003** Legumes – A boom to human nutrition. *Trends Food Sci Techn* 16: 507-18.

Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraulc A., Contic M., Legrand A. **2000** Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 373-384.

Thompson L.U. **1993** Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. Food Res Intern 26: 131-149.

Thurston D.E. Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. CPC press Taylor & Franscis **2007**.

Tietze F. **1969** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 197:502-522.

Trichopoulou A., Lagiou P., Kuper H., Trichopoulos D. **2000** Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidem Biomar Prevent* 9: 869-873.

Troszynska A., Kubicka E. **2001** Superoxide scavenging activity of seed coat extracts from legume seeds. *Pol J Food Nutr Sci* 51: 55-59.

Usui T. **2006** Pharmaceutical prospects of phrytoestrogens. *Endocrine J* 53: 7-20.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. **2004** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. **2007** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.

Van Hoorn D.E., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D. B., Van Norren K. **2002** Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmac* 451: 111-118.

Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A. **2004** Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44: 385-403.

Vasilopoulou E., Georga K., Bjoerkov J.M., Naska A., Trichopoulou A. **2005** The antioxidant properties of greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu. *Curr Med Chem – Immun, Endoc & Metab Agents* 5: 33-45.

Vechia C. **2004** Mediterranean diet and cancer. *Pub Health Nutr* 7: 965-968.

Venn B.J., Mann J.I. **2004** Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr* 58: 1443-1461.

Vermeris W., Nicholson R. Phenolic compound biochemistry. Springer **2006**.

Veskoukis A.S., Nikolaidis M.G., Kyparos A., Kokkinos D., Nepka C., Barbanis S., Kouretas D. **2008** Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:1140-54.

Veskoukis A.S., Kouretas D., Panoutsopoulos G.I. **2006** Substrate specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase for methyl- and nitrobenzaldehydes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 31: 11-6.

Vidal-Valverde C., Frías J., Sierra I., Blazquez I., Lambien F., Kuo Y.H. **2002** New functional legume food by germination. Effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *Eur Food Res Technol* 215: 472-476.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. **1998** Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Com* 247:60–4.

Viswanadha V.P., Swamidurai A.D.C., Kunga M.R. **2007** Induction of apoptosis by ginger in HEp-2 cell line is mediated by reactive oxygen species. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100: 302–307.

Walle T. **2004** Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 36: 829-837.

Wang H.K., Morris-Natschke S.L, Lee K.H. **1997** Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Med Res Rev* 17:367–425.

Wang J.C. **1996** DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-92.

Watanabe S., Uesugi S., Kikuchi Y. **2002** Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomed Pharmacother* 56: 302-312.

Wattenberg L.W. **1985** Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45: 1-8.

Wattenberg L.W. **1992** Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res* 52: S2085-2091.

Webb A.L., McCullough M. L. **2005** Dietary lignans: Potential role in cancer prevention. *Nutr Cancer* 51: 117-131.

Webb M.R., Ebeler S.E. **2004** Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. *Biochem J* 384: 527-41.

Whittaker J.W. **2000** Manganese superoxide dismutase. *Metal Ions Biol Syst* 37: 587-611.

Williamson G., Manach C. **2005** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81: S243-55.

Wood L.G., Gibson P.G., Garg M.L. **2006** A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. *J Sci Food Agric* 86: 2057-2066.

Wuttke W., Jarry H., Seidlova-Wuttke D. **2007** Isoflavones-safe food additives or dangerous drugs? *Age Res Rev* 6: 150-188.

Xu B., Chang S.K.C. **2008** Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chem* 110: 1-13.

Xu B.J., Yuan S.H., Chang S.K.C. **2007** Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J Food Sci* 72: S167-177.

Yang C.S. Laundau J. M., Huang M.T., Newmark H.L. **2001** Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406.

Yoshida T., Hatano T., Ito H. **2000** Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *BioFactors* 13: 121–125.

Yoshino M., Murakami K. **1998** Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Chem* 257: 40-44.

Yu R., Jiao J.J., Duh J.L., Gudehithlu K., Tan T.H., Kong A.N. **1997** Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 18: 451-456.

Zhang X., Rosenstein B.S., Wang Y., Lebwohl M., Wei H. **1997** Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23: 980-5.

Zhou Y., Lee A.S. 1998 Mechanism fro the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 90: 381-388.

Zielinski H. **2002** Peroxyl radical-trapping capacity of germinated legume seeds. *Nahrung/Food* 46: 100-104.

Zielonka J., Gebicki J., Grynkiewicz G. **2003** Radical scavenging properties of genistein. *Free Rad Biol Med* 35: 958-965.

Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. **2005** Ψυχανθή (Καρποδοτικά-Χορτοδοτικά). Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

Σκιαδάς Κ. **2007** Προοπτικές ανάπτυξης τομέα οσπρίων και κτηνοτροφικών φυτών. Υπ.Α.Α.Τ. 1-11.

Στεφανάκη Ν.Μ. **1999** Συστηματική βοτανική. Αγγειόσπερμα. Τόμος 1 Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.

ABSTRACT

In recent years, a lot of research has been done in the development of chemopreventive agents derived from foods which constitute integral part of human diet. Legumes, which play a crucial role in many diets worldwide, are thought to be related with beneficial heath implications in chronic diseases such as certain cancer types (colon, breast, prostate), cardiovascular diseases and diabetes. Except from their known high nutritive value, significant quantities of phytochemical compounds are identified in legumes and considered to be responsible for their beneficial effects. The heterogeneity in the varieties of legumes along with their complicated and different phytochemical composition, make important the need for further research on the bioactive compounds present in legumes and their biological properties. Thus, the aim of the present study was to evaluate the biological activities of 34 aqueous and methanolic extracts derived from 11 Greek *Leguminosae* family plants, in order to discover new chemopreventive agents. According to the results, the tested plant extracts can be considered as an important source of chemopreventive agents. More specifically, they exhibited potent radical scavenging properties and protective properties against free radical-induced DNA damage. Additionally, they affected the activity of enzymes involved in oxidative stress regulation, they inhibited the catalytic activity of topoisomerase I and had less potent antimutagenic activity against bleomycin-induced mutagenicity. The polyphenols present in the extracts were the bioactive phytochemical compounds responsible for the observed properties.

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* plant extracts exhibited the most potent chemoprentive properties. Thus, in extending the aforementioned results the aqueous aerial plant parts extract of *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* was chosen in order to evaluate its chemopreventive properties in cancer and normal cells. The results indicate that there is a possible relation between the *in vitro* antioxidant/chemopreventive properties of this extract and its properties observed in the tested cellular systems. However, there must be caution in the effective extract concentrations because beyond a critical concentration the bioactive extract components may act as prooxidants and be toxic for the cells. This is concluded by the fact that *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* plant extract at concentrations higher than 50 μg/mL had prooxidant properties. The results obtained indicate the tested legume plant extracts as important source of chemopreventive agents and suggest their use as supplements in biofunctional food. The present study indicate *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* plant as the most important source of chemopreventive agents and suggests further research on the *in vivo* properties of its extracts.

Δημοσιεύσεις

1. **C. Spanou**, D. Stagos, L. Tousias, A. Angelis, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas **2007** Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of *Leguminosae* plants using different *in vitro* assays. *Anticancer Research* 27 (5): 3403-4310.
2. **C. Spanou**, G. Bourou, A. Dervishi, N. Aligiannis, A. Angelis, D. Komiotis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas **2008** Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6967-6976.
3. **C. Spanou**, D. Stagos, N. Aligainnis, D. Kouretas **2010** Influence of potent antioxidant *Leguminosae* family plant extracts on growth and antioxidant defence system of Hep2 cancer cell line. *Journal of Medicinal Food* 13: 149-155.
4. **C. Spanou**, D. Stagos, K. Liadaki, K. Ioannou, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, Kouretas D. **2010** Protective effects of legume plant extracts on *tert*-Butyl hydroperoxide-induced oxidative stress and cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells. (under preparation).
5. **C. Spanou**, A.S. Veskoukis, D. Stagos, K. Liadaki, A.L. Skaltsounis, M. Anastasiadi, S.A. Haroutounian, D. Kouretas **2010** Effects of greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activity. *Food Chemistry* (under review).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Προφορική παρουσίαση

C. Spanou and Kouretas D., «Influence of two *Leguminosae* plant extracts on growth and antioxidant defense system of Hep2 cancer cell line» **8**th *International Conference of Anticancer Research*, Kos, Greece, 17-22 October **2008**.

POSTER

- **C. Spanou**, A. Angelis, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas, «Antioxidant and chemopreventive properties of *Vicia faba* extract and its flavonoid fractions» *7*th *Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF , Natural Products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agromedical Interest*, Athens Greece, 3-8 August, **2008**.

- **C. Spanou**, N. Aligiannis, A. L. Skaltsounis, D. Kouretas, «Effect of *Leguminosae* family plant extracts and polyphenolic fractions on topoisomerase I-induced nicking of DNA», *5th Panhellenic Meeting of Pharmacology with International Participation*, Αθήνα, Μάιος 23-25, **2008**.

- **C. Spanou**, N. Aligiannis, A-L. Skaltsounis and D. Kouretas, Effect of *Leguminosae* family plant extracts and polyphenolic fractions on topoisomerase I-induced nicking of DNA, **2008**, *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics*, ***22*** (2): 336-338.

- **Χ. Σπανού**, Δ. Στάγκος, Λ. Τούσιας, Α. Αγγελής, Ν. Αληγιάννης, ΑΛ. Σκαλτσούνης, Δ. Κουρέτας, «Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων από μοναδικές Ελληνικές ποικιλίες ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae* με τρεις *in vitro* μεθόδους», *2ο Πανελλήνιο συνέδριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων*, Αθήνα, Μάρτιος 29-31, **2007**.

- **C. Spanou**, S. Manta, D. Komiotis, A. Derbishi, D. Kouretas, «Antioxidant activity of a series fluorinated Pyrano-nucleoside Analogues of N4-benzoyl cytosine and N6-benzoyl adenine», 10th Conference in Advanced Medical Chemistry, Thessaloniki, Greece, May 25-26, **2007**.

- **C. Spanou**, D. Stagos, L. Tousias, A. Angelis, N. Aligiannis, A-L. Skaltsounis and D. Kouretas «Antioxidant of methanolic and aqueous extracts from beans and legumes against UV- and AAPH- induced DNA damage», 3rd International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine Biology, Andros, Greece, September 21-24, **2006**.

- **Χ. Σπανού**, Δ. Στάγκος, Δ. Κουρέτας, «Εκτίμηση της αντικαρκινικής δράσης φυτικών βιοδραστικών ουσιών βασιζόμενη σε συνδυασμό μοριακών μεθόδων», *Βιοεπιστήμες στον 21ο Αιώνα*, Αθήνα, Ελλάδα, Απρίλιος 13-15, **2006**.